

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie**

**der Universität des Saarlandes**

**(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)**

**Altersabhängige Modulation  
der Endotoxin-induzierten Schädigung  
der Rattenleber durch  
Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor  
(G-CSF)**

als Dissertationsschrift

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Universität des Saarlandes

2007

vorgelegt von

Sascha Pradarutti

geboren am 02.04.1975 in Cochem

In Dankbarkeit meiner Mutter gewidmet.

---

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
1.1. Altersabhängige Modulation der Endotoxin-induzierten Schädigung der Rattenleber durch Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF)	1
<b>2. Abstract</b>	4
2.1. Age-associated differences in endotoxemic rat liver injury and its modulation by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)	4
<b>3. Einleitung</b>	6
3.1. Alter und Morbidität	6
3.2. Sepsis und Endotoxinämie	7
3.2.1. Sepsis	7
3.2.2. Endotoxinämie	8
3.3. Leukozyten und Entzündungsreaktion	10
3.4. Systemische Zytokinfreisetzung in Endotoxinämie und Sepsis	12
3.5. Hepatische Mikrozirkulation	12
3.6. Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)	13
3.7. Alter - G-CSF - Sepsis	15
<b>4. Ziel der Studie</b>	17
4.1. Fragestellungen	17
<b>5. Material und Methoden</b>	18
5.1. Versuchstiere	18
5.2. Modell	18
5.2.1. Vorbehandlung und Anästhesie	18
5.2.2. Anästhesie und chirurgische Präparation	19
5.2.3. Mikrozirkulationsuntersuchung der Leber	20
5.2.4. Probenasservierung für Vollblut-, Serum- & Plasmaanalysen	22
5.2.5. Probenasservierung zur Vitamin A-Bestimmung im Leberparenchym	22

---

5.3. Untersuchungstechniken .....	23
5.3.1. Makrohämodynamik .....	23
5.3.2. Mikrozirkulation .....	23
5.3.2.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Farbstoffe .....	23
5.3.2.2. Auswerteeinheit .....	25
5.3.3. Mikrozirkulatorische Parameter .....	25
5.3.3.1. Lebergeometrie .....	27
5.3.3.2. Sinusoidale Dichte und Perfusionsrate .....	29
5.3.3.3. Blutzellgeschwindigkeit und volumetrischer Blutfluß .....	30
5.3.3.4. Analyse der hepatischen Sternzellen .....	31
5.3.3.5. Sinusoidales Leukozytenfließverhalten .....	33
5.3.3.6. Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen .....	34
5.3.3.7. Kupfferzellaktivität und –verteilung .....	35
5.3.4. Vollblut-, Serum- und Plasmaanalytik .....	36
5.3.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, systemischer Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl .....	36
5.3.4.2. Laborchemische Untersuchung der Aktivität leberspezifischer Enzyme .....	36
5.3.4.3. Zytokinbestimmung .....	37
5.3.5. Bestimmung der Vitamin A- Konzentration im Lebergewebe .....	37
5.3.6. Erfassung des Galleflusses .....	38
5.4. Experimentelles Protokoll .....	40
5.4.1. Altersabhängige Unterschiede der Physiologie und Anatomie der Rattenleber (Altersstudie) .....	40
5.4.2. Altersabhängige Modulation der LPS-induzierten Immun- antwort durch G-CSF (Sepsisstudie) .....	41
5.5. Statistik .....	43
5.5.1. Datenerfassung und statistische Auswertung .....	43
<b>6. Ergebnisse der Altersstudie .....</b>	<b>44</b>
6.1. Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht .....	44
6.2. Makrohämodynamik .....	44
6.3. Lebermorphologie und hepatische Mikrozirkulation .....	45
6.3.1. Azinäre Größe .....	46

---

6.3.2. Venulo-venulärer Abstand.....	47
6.3.3. Geometrie der postsinusoidalen Venolen.....	48
6.3.4. Sinusoidales Verteilungsmuster im Azinus.....	49
6.3.5. Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Sinusoiden und sinusoidaler Blutfluß.....	50
6.3.6. Sinusoidale und postsinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	51
6.3.7. Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen und deren Verteilung im Azinus.....	53
6.3.8. Hepatische Sternzellen.....	55
6.4. Vollblut- und Serumanalytik.....	57
6.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl.....	57
6.4.2. Aktivität der leberspezifischen Enzyme im Serum .....	59
6.5. Gallefluss.....	60
6.6. Vitamin A Bestimmung im Leberparenchym.....	60
6.7. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
6.7.1. Makrohämodynamik, Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht, Gallefluss, Vollblut- und Serumanalytik.....	63
6.7.2. Lebermorphologie und Vitamin A-Konzentration im Lebergewebe.....	64
6.7.3. Sinusoidale und postsinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen.....	65
6.7.4. Kupfferzellverteilung und –phagozytoseaktivität.....	65
<b>7. Ergebnisse der Sepsistudie.....</b>	<b>66</b>
7.1. Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht.....	66
7.2. Makrohämodynamik.....	66
7.3. Mikrozirkulation.....	67
7.3.1. Sinusoidale Perfusionsrate.....	67
7.3.2. Sinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	68
7.3.2.1. Frei fließende Leukozyten.....	68
7.3.2.2. Temporär stagnierende Leukozyten.....	69
7.3.2.3. Dauerhaft stagnierende Leukozyten.....	70
7.3.3. Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	72
7.3.3.1. Frei Fließende Leukozyten.....	72
7.3.3.2. Rollende Leukozyten.....	73
7.3.3.3. Adhärente Leukozyten.....	73

---

7.3.4. Kuppferzellaktivität .....	74
7.4. Vollblut-, Blutserum- und Blutplasmaanalytik .....	76
7.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl .....	76
7.4.2. Aktivität der leberspezifischen Enzyme im Serum .....	79
7.4.3. Systemische Zytokine und Chemokine .....	80
7.5. Gallefluss .....	83
7.6. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	84
7.6.1. Systemische Parameter .....	84
7.6.2. Hepatische Mikrozirkulation .....	84
7.6.3. Kupfferzellen .....	86
7.6.4. Aktivität der leberspezifischen Enzyme .....	86
7.6.5. Zytokine und Chemokine .....	87
<b>8. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
8.1. Diskussion des Modells .....	88
8.2. Diskussion der Untersuchungstechniken .....	92
8.3. Diskussion der physiologischen Altersunterschiede in der Rattenleber .....	98
8.4. Diskussion der LPS-Exposition und G-CSF-Vorbehandlung im altersgestaffelten Tiermodell .....	102
8.5. Schlußfolgerung .....	107
<b>9. Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>108</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>110</b>
<b>11. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>133</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Altersabhängige Modulation der Endotoxin-induzierten Schädigung der Rattenleber durch Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF)

Sepsis ist ein häufiges Krankheitsbild und trotz aller Fortschritte der modernen Medizin noch immer mit hoher Morbidität und Mortalität behaftet. Die klinische Beobachtung, dass Sepsis-assoziierte Morbidität und Mortalität mit dem Alter deutlich zunimmt, gewinnt aufgrund der sich wandelnden Alterszusammensetzung unserer Gesellschaft zusätzlich an Bedeutung.

Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, bekannt geworden als hämatopoetischer Wachstumsfaktor, ist zu Beginn der 90er Jahre als immunmodulierendes Agens erkannt worden und wird mittlerweile adjuvant zur Therapie der Sepsis eingesetzt. Auch tierexperimentell konnte bei systemischer Endotoxinämie eine Protektion durch G-CSF beobachtet werden. Unklar ist jedoch, inwieweit eine derartige Immunmodulation auch im Alter von Erfolg ist.

Unter Verwendung eines altersgestaffelten Tiermodells mit Ratten von 3, 12 und 24 Monaten galt es daher zu klären, inwieweit G-CSF in Abhängigkeit zum Alter bei systemischer Endotoxinämie protektiv ist. Dies untersuchten wir anhand der systemischen Zytokin-Freisetzung und der lokalen mikrovaskulären Schädigung der Leber, die intravitalmikroskopisch erfasst wurde.

Tiere aller Altersgruppen erhielten Endotoxin (10mg/kg i.v.) und randomisiert 1 h vor Endotoxin-Gabe entweder G-CSF (200µg/kg i.v.) oder Trägerlösung. Die intravital-mikroskopische Untersuchung und die Gewinnung der Blutproben erfolgte 6 Stunden nach Endotoxinexposition.

Da im Gegensatz zu anderen Organsystemen der normale Alterungsprozess der Leber nur unzureichend bekannt ist, haben wir in einer gesonderten Studie intravitalmikroskopische Untersuchungen an Lebern von Ratten der Altersgruppen 1 Monat, 3, 12 und 24 Monate durchgeführt.

In den Untersuchungen zur altersabhängigen Physiologie der Rattenleber zeigte sich, daß die Leber bereits bei 1 Monat alten Versuchstiere ihre volle Größe im Verhältnis zum Körpergewicht und Funktion besaß. Die Leberarchitektur unterlag im Alter von 1 Monat bis zu 24 Monaten einem fortschreitenden Wachstum der Lobuli und der postsinusoidalen Venolen mit einer proportionalen Zunahme der Länge, des Durchmessers und des intervaskulären Abstandes. Im Gegensatz zu der 3,5 fachen Zunahme der lobulären Einheit nahm die sinusoidale Dichte mit zunehmendem Alter nur auf 87% des Wertes bei 1 Monat

alten Tieren ab, was eine Rekrutierung oder Neubildung von Sinusoiden mit zunehmendem Alter impliziert. Die sinusoidale Perfusionsrate lag bei allen Altersgruppen über 98%. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen unterschieden sich nicht zwischen den Altersgruppen und lagen im Bereich physiologisch bekannter Werte; auch unterschied sich weder die zonale Verteilung der Kupfferzellen in den Altersgruppen noch die Kinetik der Latexpartikel-Phagozytose als Marker für die Kupfferzellaktivität. Die mit den hepatischen Sternzellen assoziierte Fläche der Vitamin A-Autofluoreszenz korrelierte signifikant mit der altersabhängigen Zunahme des Vitamin A-Gehaltes der Leber. Biochemische Parameter als Marker für die hepatozelluläre Integrität unterschieden sich nicht zwischen den Altersgruppen.

Nach alleiniger Endotoxin-Exposition war eine altersabhängige Zunahme der systemisch-inflammatorischen Antwort auffällig, deutlich erkennbar an dem Anstieg von Interleukin-1 $\beta$  und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bei 12 und 24 Monate alten Tieren. Darüberhinaus war die intrahepatische Leukozytenakkumulation, als sinusoidale Leukozyten-Stase angegeben, mit zunehmendem Alter verstärkt. Auch das nutritive Perfusionsversagen der Leber war bei 12 und 24 Monate alten Tieren wesentlich stärker als bei 3 Monate alten Tieren ausgeprägt.

Während sich die Kupfferzell-Aktivität bei alleiniger Endotoxin-Exposition zwischen den Altersstufen nicht unterschied, führte G-CSF zu einer signifikanten Dämpfung der Endotoxin-induzierten Kupfferzellaktivierung bei 3 und 12 Monate alten Tieren, nicht jedoch bei den 24 Monate alten Tieren. Auch die Endotoxin-assoziierte sinusoidale Leukozytenstase wurde durch G-CSF nur bei jüngeren, nicht aber alten Tieren vermindert.

Einhergehend mit der signifikanten Dämpfung der Kupfferzell-Aktivität bei den 3- und 12-Monate alten Tieren war die Plasmakonzentration von Interleukin-1 $\beta$  durch Vorbehandlung mit G-CSF bei diesen Tieren deutlich reduziert. Vergleichbar konnte dies auch für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  beobachtet werden. Alte Tiere zeigten hingegen - nach G-CSF Vorbehandlung und Endotoxin-Exposition - keine entsprechende Reduktion der systemischen Zytokinantwort.

In vergleichbarer Weise führte G-CSF zu einer signifikanten Reduktion der Plasmakonzentrationen von Interleukin-6 bei 3 und 12 Monate alten Tieren. Bei 24 Monate alten Endotoxin-exponierten Tieren konnte hingegen nach G-CSF sogar eine leichte Zunahme von Interleukin-6 beobachtet werden. Obgleich Interferon- $\gamma$  nach alleiniger Endotoxin-Exposition mit dem Alter abnahm, führte die Vorbehandlung mit G-CSF wiederum zur Abnahme der Konzentrationen bei jungen, hingegen zur Zunahme der Konzentrationen bei alten Tieren.

Als Folge dieser eingeschränkten systemisch-inflammatorischen Antwort konnten wir bei den jungen Versuchstieren eine Reduktion der lokalen Schädigung der Leber beobachten. So war nach G-CSF das nutritive Perfusionsversagen der septischen Leber und die Freisetzung von Transaminasen bei 3 und 12 Monate alten Tieren signifikant geringer ausgeprägt, während G-CSF bei 24 Monate alten Tieren keine Protektion zeigte.



---

Endotoxinämie im Alter ist durch eine erhöhte Zytokin-Freisetzung charakterisiert, wohl mit der Konsequenz einer stärkeren Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und Parenchymintegrität der Leber. Vorbehandlung durch G-CSF ist in der Lage, bei jungen und ausgewachsenen, nicht aber bei alten Tieren die systemisch-inflammatorische Antwort auf Endotoxin und damit die Hepatotoxizität wirksam zu reduzieren. Bei alten Patienten sollte somit die Indikation zur Gabe von G-CSF zur adjuvanten Therapie der Sepsis kritisch diskutiert werden.

## 2. Abstract

### 2.1. Age-associated differences in endotoxemic rat liver injury and its modulation by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)

Sepsis is a frequent clinical picture and despite of all progress in modern medicine is still afflicted with high morbidity and mortality. The clinical observation that sepsis-related morbidity and mortality increases with age clearly gains importance because of the changing age composition of our society.

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), known as a hematopoietic growth factor, has been recognized at the beginning of the 90s as an immuno-modulating agent and is used meanwhile adjuvant in the therapy of sepsis. Although protection could be observed by G-CSF in animal studies with endotoxemia, it is still unclear, if immuno-modulation with G-CSF is also effective in aged animals.

Hence it has to be clarified, if G-CSF is protective in dependence to age with systemic endotoxemia. We examined this with the use of an age-graded animal model with rats of 3, 12 and 24 months on the basis of systemic cytokine production and hepatic microvascular injury.

Animals of all age groups received endotoxin (10 mg / kg i.v.) and, randomised 1 h before endotoxin, either G-CSF (200 µg / kg i.v.) or inert fluid. Intravital fluorescence microscopic analysis and sampling of blood was performed 6 hours after exposure to endotoxin.

In contrast to other organ systems the normal aging process of the liver is known only insufficiently. Therefore, we have investigated in a separate study physiological changes in livers of rats of different age (1 month, 3, 12 and 24 months) using high resolution multifluorescence in vivo microscopy.

It seemed that already at 1 month of age the liver attained its full size and functional capacity, as assessed by relative organ weight and hepatic bile flow. Survey of liver architecture revealed a progressive growth of lobular area with postsinusoidal venules exhibiting a proportional increase in length, diameter and intervascular distance till the age of 12 to 24 months. With respect to the 3.5- to 4-fold increase of lobular units, the minor reduction of sinusoidal density to 87% during ageing strongly implies the recruitment and formation of new sinusoidal microvessels as contributing mechanism to meet oxygen demand due to overall tissue enlargement. Sinusoidal perfusion rate remained above 98% over the whole lifespan. Leukocytic interaction with the hepatic microvascular endothelium was found within the physiological range in all age groups. Moreover, kinetics of clearance of latex particles as well as lobular distribution of Kupffer cells did not differ between animals of

different age. Hepatic stellate cell-associated area of ultraviolet vitamin A-autofluorescence increased with age and significantly correlated with increasing tissue concentrations of vitamin A metabolites. Biochemical parameters serving as measures of tissue integrity did not indicate age-associated tissue alterations.

An increase of the systemic inflammatory action after endotoxin exposure was remarkable dependent on age of the animals. This was clearly indicated by the increase of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in 12 and 24 months old rats. Beyond this, the hepatic leukocyte accumulation, shown as sinusoidal leukocyte stasis, was strengthened with increasing age. Also, hepatic nutritive perfusion failure was substantially stronger in 12 and 24 months old animals than in young animals.

While the activity of Kupffer cells did not differ after endotoxin exposure between different age groups, G-CSF led to a significant dampening of endotoxin-induced Kupffer cell phagocytic activity in 3 and 12 months old animals, but not in 24 months old animals. Also, endotoxin-related sinusoidal leukocyte stasis was decreased by G-CSF only in younger, but not in old animals.

With the significant dampening of the Kupffer cell activity in 3 and 12 months old animals, the plasma concentration of interleukin-1 $\beta$  was clearly reduced by pretreatment with G-CSF in these animals. Comparably this could be observed also for tumor necrosis factor- $\alpha$ . However, old animals showed no reduction of endotoxin-induced cytokine response after G-CSF pretreatment.

In parallel, G-CSF led to a significant reduction of the plasma concentrations of interleukin-6 in 3 and 12 months old animals. In contrast, in old endotoxemic animals even a slight increase of interleukin-6 could be observed after G-CSF. Although interferon- $\gamma$  decreased after endotoxin exposure with age, the pretreatment with G-CSF again led to a decrease of concentration in young, but to an increase of concentration in old animals.

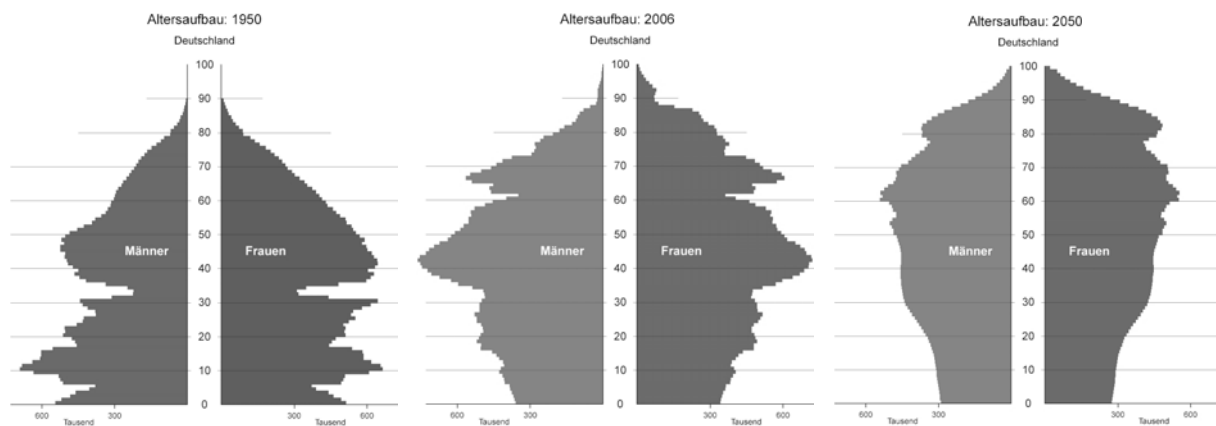
As a result of the restricted systemic inflammatory response in young animals, we could observe a reduction of the local hepatic damage. Thus, nutritive hepatic perfusion failure and the release of transaminases were reduced after G-CSF in 3 and 12 months old endotoxemic animals, while G-CSF showed no protection in 24 months old animals.

Endotoxemia in age is characterized by a raised cytokine release, probably with the consequence of a stronger impairment of hepatic microcirculation and hepatocellular integrity. Pretreatment with G-CSF is able to reduce the systemic inflammatory response to endotoxin and with this the hepatotoxicity efficiently in 3 and 12 months old, but not in 24 months old animals. Therefore in old patients the indication for G-CSF as an adjuvant therapy of sepsis should be discussed with caution.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Alter und Morbidität

Der Anteil der über 65 Jährigen in unserer Gesellschaft steigt in den nächsten Jahrzehnten weiterhin deutlich an (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2002). Fortschritte sowohl in der chirurgischen wie auch in der anästhesiologischen Behandlung älterer Menschen erhöhen zudem die Anzahl älterer Patienten auf Intensivstationen. Obwohl nicht bei jedem Individuum Alter einen Effekt auf alle Parameter des Immunsystems hat, unterscheiden sich doch die meisten Immunfunktionen älterer im Vergleich zu jüngeren Individuen (THOMAN et al, 1989). So steigt mit zunehmenden Alter sowohl die Morbidität als auch die Mortalität, wie in zahlreichen Studien sowohl klinisch als auch experimentell gezeigt werden konnte, an (BERK et al, 1983; DJAIANI et al, 1997; FINKELSTEIN et al, 1983; MILLER, 1989; SALTZMAN et al, 1987; TURNBULL et al, 2003).



**Abbildung 1:** Bevölkerungsentwicklung in Deutschland 1950, 2006 und geschätzt 2050. Darstellung als Alterspyramide. Quelle: (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2002).

Eine altersabhängige Störung der endogenen Zytokinproduktion mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) als Antwort auf Stimulation mit Lipopolysaccharid konnte tierexperimentell gezeigt werden (CHORINCHATH et al, 1996). Auch die Eigenschaften der Kupffer-Zellen, sessiler Makrophagen in der Leber, scheinen sich mit zunehmendem Alter zu verändern und dadurch

zumindest teilweise für eine gestörte Immunfunktion und eine erhöhte Sensitivität für Toxine verantwortlich zu sein (KNOOK et al, 1989; YAMANO et al, 1998). Weiterhin nimmt mit zunehmendem Alter die Fähigkeit des Organismus ab, adäquat auf Umweltbelastungen zu reagieren, wie sich in der Abnahme der Induktion von Hitze-Schock-Protein-70 in alten Hepatozyten (GUTSMANN-CONRAD et al, 1999) zeigt. Der exakte physiologische bzw. pathophysiologische Mechanismus, der für die beeinträchtigte Immunfunktion und erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen im Alter verantwortlich ist, bleibt jedoch weiterhin unklar.

## 3.2. Sepsis und Endotoxinämie

### 3.2.1. Sepsis

Sepsis ist ein klinisches Syndrom, das in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. So beträgt die Inzidenz in den USA 400.000 Erkrankungen pro Jahr und die 28 Tage-Mortalität liegt in der Sepsis bei 34 bis 52 % (WOLTMANN et al, 1998). Eine Liste diagnostischer Kriterien der Sepsis ist in Abbildung 2 dargestellt und zeigt das Ergebnis der „International Sepsis Definitions Conference“ von 2002 (LEVY et al, 2003). Auch beschrieben als „horror autotoxicus“, findet in der Sepsis eine sich selbst erhaltende Immunreaktion mit konsekutiver Schädigung des eigenen Organismus statt (HOTCHKISS et al, 2003; RENSING et al, 2001). Beteiligt sind sowohl zelluläre e.g. Kupfferzellen als auch humorale Bestandteile e.g. Chemokine, Zytokine und Sauerstoffradikale (CHAUDRY, 1999; HEIDECKE et al, 2000; KRAGSBJERG et al, 1996). Wichtiges Abgrenzungsmerkmal zu dem verwandten Syndrom „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) ist bei der Sepsis der Nachweis von Mikroorganismen (LEVY et al, 2003).

Diagnostic criteria for sepsis	<p data-bbox="515 226 1417 280"><b>Infection<sup>a</sup></b> Documented or suspected <i>and</i> some of the following<sup>b</sup>:</p> <p data-bbox="515 324 1417 526"><b>General parameters</b> Fever (core temperature <math>&gt;38.3^{\circ}\text{C}</math>) Hypothermia (core temperature <math>&lt;36^{\circ}\text{C}</math>) Heart rate <math>&gt;90</math> bpm or <math>&gt;2</math> SD above the normal value for age Tachypnea: <math>&gt;30</math> bpm Altered mental status Significant edema or positive fluid balance (<math>&gt;20</math> ml/kg over 24 h) Hyperglycemia (plasma glucose <math>&gt;110</math> mg/dl or <math>7.7</math> mM/l) in the absence of diabetes</p> <p data-bbox="515 548 1417 705"><b>Inflammatory parameters</b> Leukocytosis (white blood cell count <math>&gt;12,000/\mu\text{l}</math>) Leukopenia (white blood cell count <math>&lt;4,000/\mu\text{l}</math>) Normal white blood cell count with <math>&gt;10\%</math> immature forms Plasma C reactive protein <math>&gt;2</math> SD above the normal value Plasma procalcitonin <math>&gt;2</math> SD above the normal value</p> <p data-bbox="515 728 1417 1064"><b>Hemodynamic parameters</b> Arterial hypotension<sup>b</sup> (systolic blood pressure <math>&lt;90</math> mmHg, mean arterial pressure <math>&lt;70</math>, or a systolic blood pressure decrease <math>&gt;40</math> mmHg in adults or <math>&lt;2</math> SD below normal for age) Mixed venous oxygen saturation <math>&gt;70\%</math><sup>b</sup> Cardiac index <math>&gt;3.5</math> l min<sup>-1</sup> m<sup>-2c,d</sup> <b>Organ dysfunction parameters</b> Arterial hypoxemia (<math>\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 &lt;300</math>) Acute oliguria (urine output <math>&lt;0.5</math> ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> or 45 mM/l for at least 2 h) Creatinine increase <math>\geq 0.5</math> mg/dl Coagulation abnormalities (international normalized ratio <math>&gt;1.5</math> or activated partial thromboplastin time <math>&gt;60</math> s) Ileus (absent bowel sounds) Thrombocytopenia (platelet count <math>&lt;100,000/\mu\text{l}</math>) Hyperbilirubinemia (plasma total bilirubin <math>&gt;4</math> mg/dl or 70 mmol/l)</p> <p data-bbox="515 1086 1417 1180"><b>Tissue perfusion parameters</b> Hyperlactatemia (<math>&gt;3</math> mmol/l) Decreased capillary refill or mottling</p>
--------------------------------	--

<sup>a</sup> Defined as a pathological process induced by a micro-organism

<sup>b</sup> Values above 70% are normal in children (normally 75–80%) and should therefore not be used as a sign of sepsis in newborns or children

<sup>c</sup> Values of 3.5–5.5 are normal in children and should therefore not be used as a sign of sepsis in newborns or children

<sup>d</sup> Diagnostic criteria for sepsis in the pediatric population is signs and symptoms of inflammation plus infection with hyper- or hypothermia (rectal temperature  $>38.5^{\circ}\text{C}$  or  $<35^{\circ}\text{C}$ ), tachycardia (may be absent in hypothermic patients) and at least one of the following indications of altered organ function: altered mental status, hypoxemia, elevated serum lactate level, and bounding pulses

**Abbildung 2:** Übersichtstabelle der diagnostischen Sepsiskriterien der Konsensuskonferenz von 2002 nach Levy et al..

### 3.2.2. Endotoxinämie

Endotoxinämie bezeichnet das Vorhandensein von Endotoxin im Blut. Endotoxin, chemisch ein Lipopolysaccharid (LPS), ist eine Komponente der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien, der auch beim Zerfall dieser Bakterien als Folge einer Immunreaktion freigesetzt wird. Gram-negative Bakterien sind in fast 50% der Fälle für das Entstehen einer Sepsis verantwortlich (HEINE et al, 2001; HOLST et al, 1996; RIETSCHER et al, 1996; WOLTMANN et al, 1998). Das freigesetzte Endotoxin ist ein Hauptauslöser der Sepsis (COHEN et al, 1991; HIRATA et al, 1980; WOLTMANN et al, 1998). Auch bei alleiniger intravenöser Applikation von Endotoxin entsteht im Tierversuch ein sepsisartiges Krankheitsbild (CHORINCHATH et al, 1996; REMICK et al, 2005).

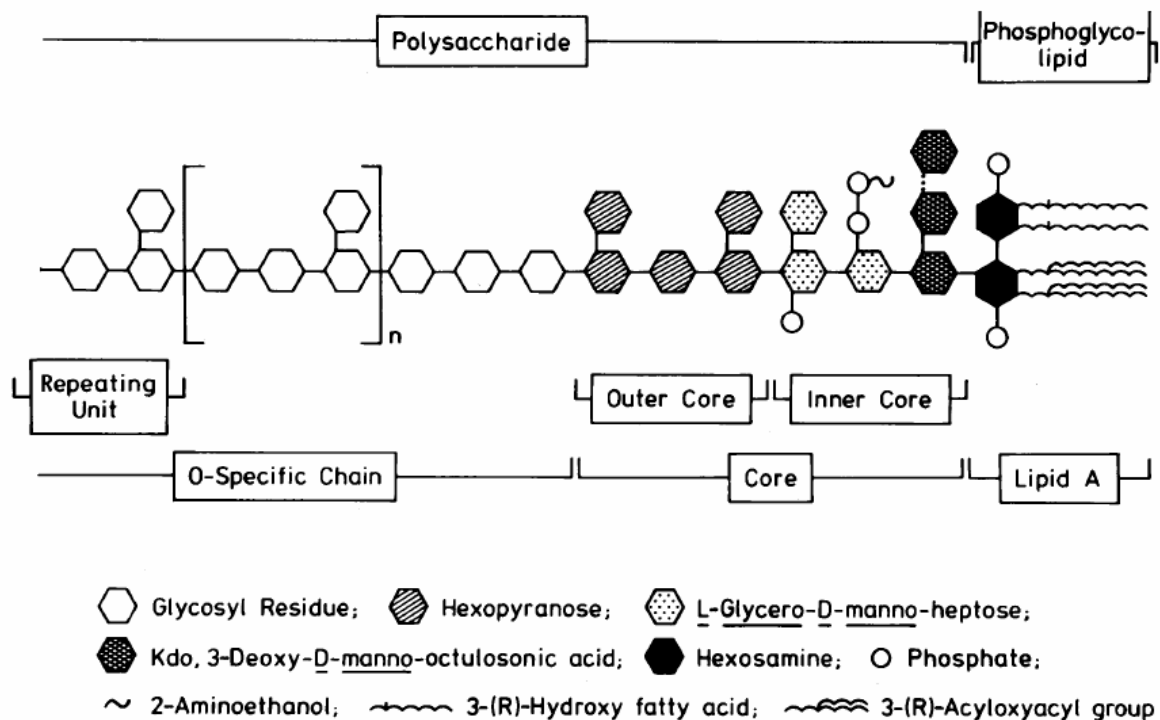


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Lipopolysaccharid-Moleküls

Endotoxin besteht aus 3 Untereinheiten, der O-spezifischen Kette, der Core-Region und der Lipid-A-Komponente. Die O-spezifische Kette ist ein Heteropolymer von sich wiederholenden Oligosacchariden. Diese Komponente ist Serotyp spezifisch, weist jedoch zwischen unterschiedlichen Serotypen eine hohe Variabilität auf. Der Core-Teil ist weniger variabel und besteht aus 2 Segmenten. Dieser Teil ist unter den bioaktiven Formen des LPS weitgehend einheitlich. Die Lipid A-Komponenten unterscheiden sich hauptsächlich durch die Anzahl, Lokalisation und Länge ihrer Fettketten. Lipid A bedingt die endotoxische Wirkung von Endotoxin und bewirkt die gleichen Effekte, wie LPS. Durch die amphiphile Struktur von LPS aggregieren einzelne LPS-Moleküle in Lösung zu Supramoleküle. In dieser dreidimensionalen Struktur ist LPS biologisch unwirksam (HEINE et al, 2001; HOLST et al, 1996; RIETSCHHEL et al, 1996; WOLTMANN et al, 1998). Biologisch aktiv ist nur das LPS-Monomer, wobei der Prozess der Monomerisation durch das körpereigene LPS-bindende Protein (LBP) vermittelt wird. LBP ist jedoch auch für die Katalyse von LPS zu HDL, also

dessen biologischen Abbau und Inaktivierung verantwortlich (FLETCHER et al, 1993; HEINE et al, 2001; HOLST et al, 1996; RIETSCHEL et al, 1996).

Die Effekte von Endotoxin sind die Ergebnisse der Interaktion körpereigener Zellen mit Endotoxin und der daraus folgenden Leukozyten-Aktivierung und der Produktion und Freisetzung endogener Mediatoren (GALANOS et al, 1993; KOPYDLOWSKI et al, 1999; MAYER et al, 1991; WAAGE et al, 1989). Endotoxin interagiert mit Makrophagen und Monozyten, aber auch mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen und neutrophilen Leukozyten. Bereits in niedrigen Konzentrationen bindet Endotoxin an CD14, wobei mCD14 (in der Zellmembran myeloider Zellen) und sCD14 („soluble“ im Plasma) unterschieden werden (SCHUMANN et al, 1994). In höheren Konzentrationen bindet LPS auch an einen auf der Zellmembran der Leukozyten exponierten Komplex aus CD11c und CD18 (WINDSOR et al, 1993).

Über beide Bindungen kommt es zu einer Aktivierung der Zellen mit der Folge, dass unterschiedliche immunmodulierende Substanzen gebildet und freigesetzt werden. Diese sind in 3 Gruppen einteilbar: Lipide (e.g. Prostaglandin E2), Sauerstoffradikale und Proteine (e.g. Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ) (HEINE et al, 2001).

Interessant ist die These, daß LPS für die körpereigene Immunantwort unabdingbar sei. So werden niedrige Plasmakonzentrationen gerade im Bereich des Intestinaltraktes für eine ausreichende und adäquate Immunantwort verantwortlich gemacht, die eine übermäßige Translokation von Bakterien aus dem Darm verhindert. Eine Blockade dieser basalen LPS Stimulation führt zu einer höheren Infektionsrate durch Translokation von Bakterien aus dem Darm (ALEXANDER et al, 2001; GEBBERS et al, 2004; HOLST et al, 1996; RIETSCHEL et al, 1996; WOLTMANN et al, 1998).

### 3.3. Leukozyten und Entzündungsreaktion

Leukozyten als Träger spezifischer und unspezifischer Abwehrfunktionen des Organismus besitzen die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Dies ermöglicht ihnen eine effektive Abwehr gegen individualfremde Antigene wie Bakterien, Viren, Protozoen, Würmer oder Pilze, gegen Allotransplantate und



Tumorzellen (WARNATZ, 1994). Leukozyten als zelluläre Elemente des Immunsystems dienen daher der Wahrung der Identität und Integrität des Individuums (MEDAWAR, 1957). Neben den zum Schutz des Organismus sinnvollen Abwehrfunktionen können Leukozyten aber auch durch fehlgeleitete und/oder überschießende Reaktionen eine Schädigung des Gewebes verursachen. Solche immunpathologischen Prozesse haben eine wesentliche Bedeutung in der Entstehung des akuten Lungenversagens (BRIGHAM et al, 1984; HOLMAN et al, 1988; SCHMELING et al, 1989), der Atherosklerose (JORIS et al, 1983), Abstoßung von Transplantaten (MARZI et al, 1992; POST et al, 1993), Schock (VEDDER et al, 1989), Trauma und Multiorganversagen (GORIS et al, 1985; NUYTINCK et al, 1988) sowie ischämischen Insulten des Gehirns (DEL ZOPPO et al, 1991), Ischämie/Reperfusion von glatter und quergestreifter Muskulatur (BAGGE et al, 1980; CARDEN et al, 1990; GRISHAM et al, 1986; MENDER et al, 1992b; MENDER et al, 1992a), Ischämie der Haut (BARKER et al, 1988), bei Myokardinfarkt (LEHR et al, 1993) oder Ischämie und Reperfusion der Leber (JAESCHKE et al, 1990; VOLLMAR et al, 1994b). Ebenfalls ist in der Sepsis eine überschießende Immunreaktion mit einer Aktivierung der Leukozyten zu beobachten (GLAUSER et al, 1991; JAESCHKE et al, 1997; PENBERTHY et al, 1997; VOLLMAR et al, 1993; VOLLMAR et al, 1996a; VOLLMAR et al, 1994b; VOLLMAR et al, 1995; WANNER et al, 1996; ZIVOT et al, 1995). Als Folge einer Leukozytenaktivierung kommt es zu einer Produktion und Freisetzung von Mediatorstoffen (DEVRIES et al, 1999; GALE et al, 1999; GIROIR, 1993; HYDE et al, 1992; KOPYDLOWSKI et al, 1999; ROILIDES et al, 1992; WAAGE et al, 1989). Als Zeichen der Leukozytenaktivierung treten außerdem Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen auf (BAUER et al, 1994; BRIGHAM et al, 1984; CARDEN et al, 1990; JAESCHKE et al, 1997; PENBERTHY et al, 1997; VOLLMAR et al, 1993), die auch *in vivo* gezeigt werden konnten. Beschrieben wurden auch unterschiedliche Qualitäten der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion am Beispiel des Endothels der hepatischen postsinusoidalen Venole (MENDER et al, 1996; VOLLMAR et al, 1996a). Weiter ist bekannt, daß es zu einer vermehrten Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen, den sessilen Makrophagen in der Leber, kommt (VOLLMAR et al, 1996b).

### 3.4. Systemische Zytokinfreisetzung in Endotoxinämie und Sepsis

Der komplexe Prozess der Immunantwort auf eindringende Pathogene beinhaltet auch die Produktion und Freisetzung proinflammatorischer, antiinflammatorischer und immunmodulierender Zytokine wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) (BELARDELLI, 1995; DAMAS et al, 1997; KRAGSBJERG et al, 1996; KUHNS et al, 1995; REMICK et al, 1990; ROILIDES et al, 1992; THIJS et al, 1995; WAAGE et al, 1989). Ein besonderes Interesse galt in den vergangenen Jahren auch einer speziellen Untergruppe der Zytokine, den Chemokinen, die chemotaktisch Leukozyten stimulieren (GALE et al, 1999). Auch diese Chemokine, die definiert sind als Zytokine, die chemotaktisch wirksam, 7-14 kDa groß und Heparin-bindend sind, werden vermehrt in Endotoxinämie und Sepsis freigesetzt (KOPYDLOWSKI et al, 1999).

Eine moderate Synthese proinflammatorischer Zytokine scheint für eine effektive Abwehrreaktion des Immunsystems jedoch notwendig zu sein. So scheiterten auch klinische Studien mit sogenannten „Anti-Zytokin-Strategien“ ohne Verbesserung der Überlebensrate, in denen Zytokine bei Endotoxinämie oder Sepsis selektiv blockiert wurden (DINARELLO, 2001; MINNICH et al, 2004; VAN DER et al, 1999).

### 3.5. Hepatische Mikrozirkulation

Die Leber ist ein Organ mit hoher Stoffwechselaktivität und starker Durchblutung, die einige morphologische Besonderheiten bezüglich der Mikroangioarchitektur aufweist. Die Kapillaren der Leber, die sogenannten Sinusoide, sind im Mittel weniger als 300 $\mu$ m lang und mit 6-15 $\mu$ m im Vergleich zum kapillären Strombett anderer Organe besonders weit. Sie besitzen ein fenestriertes Endothel ohne Basalmembran, was dem intensiven Stoffaustausch zwischen sinusoidalem Blut und Parenchym dient (MCCUSKEY, 1983). Zwischen Endothelzellen und Leberepithelien liegt der perisinusoidale Disse'sche Raum, in den die Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen. Als strukturelle und funktionelle Baueinheit der Leber gilt der Azinus, der eine Unterteilung des klassischen hexagonalen Leberläppchens

darstellt (RAPPAPORT et al, 1954). Entsprechend einem Gradienten, der die unterschiedliche Stoffwechsel-, Speicher- und Syntheseleistung sowie Enzymausstattung und Entgiftungsfunktion entlang der Lebersinusoiden betrifft, lässt sich der Azinus in die Zonen periportal, midzonal und periportal einteilen (EILERS et al, 1993; RAPPAPORT, 1973; RAPPAPORT, 1976). Im periportalen Segment zeigen die Sinusoide einen geringeren Durchmesser und stärkere Tortuosität als in den folgenden Segmenten. Außerdem zeigt sich von periportal nach perizentral ein Zusammenfließen von Sinusoiden. Dadurch nimmt die Gesamtzahl sinusoidaler Segmente entlang der zonalen Unterteilung des Azinus ab, der Blutfluss und die Strömungsgeschwindigkeit in den einzelnen Sinusoiden jedoch zu (KOMATSU et al, 1990).

Störungen der hepatischen Mikrozirkulation ergeben sich bei Trauma (NUNES et al, 1970), Schock (CHUN et al, 1994; VOLLMAR et al, 1994a; VOLLMAR, 1995) und Multiorganversagen (RENSING et al, 2001) sowie Sepsis (VOLLMAR et al, 1993; VOLLMAR et al, 1997).

Von besonderem Interesse ist, dass die Physiologie und Pathophysiologie der hepatischen Mikrozirkulation tierexperimentell mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden kann (VOLLMAR et al, 1998b; VOLLMAR et al, 1998a). Sowohl Perfusionsstörungen als Zeichen einer Schädigung (VOLLMAR et al, 1996a) als auch Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als möglicher Auslöser der beobachteten Mikrozirkulationsstörungen (MENDER et al, 1996; VOLLMAR et al, 1994b) lassen sich qualitativ und quantitativ erfassen.

Wenig bekannt ist jedoch über Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation sowohl im Bereich der Sinusoide als auch der postkapillären Venolen in Abhängigkeit zum Alter – insbesondere nicht bei Endotoxinämie und Sepsis.

### 3.6. Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)

Kolonie-stimulierende Faktoren wurden als hämatopoetische Wachstumsfaktoren identifiziert. Das primäre Einsatzgebiet dieser Faktoren war eine Stimulation von hämatopoetischen Stammzellen bei einer pathologisch verminderten Zellzahl einer hämatopoetischen Zellreihe (MOORE, 1991). Klinisch treten solche pathologisch erniedrigten

Zellzahlen im hämatologischen System oft im Rahmen von Radio- und/oder Chemotherapie auf und werden auch heute noch mit Kolonie-stimulierenden Wachstumsfaktoren behandelt (LONG et al, 1995; MOORE, 1991; NACHBAUR et al, 1997; RIEPL et al, 1997).

Ein weiterer Effekt der Kolonie-stimulierenden Faktoren ist eine Aktivierung bzw. Modulation des zellulären Immunsystems (ALLEN et al, 1997; HAKANSSON et al, 1997; PRICE et al, 1996). Auch konnte ein protektiver Effekt einer Behandlung mit G-CSF bzw. GM-CSF bei Entzündungsreaktionen, wie z.B. Wundinfektionen (GAMELLI et al, 1995), Pneumonie (SMITH et al, 1995), neonatalen Infektionen (CARR et al, 2003), HIV (MILES, 1991), Peritonitis (BARSIG et al, 1996) und Sepsis (BUSCH et al, 2004; GORGEN et al, 1992; GROSS-WEEGE et al, 1997; LUNDBLAD et al, 1996; MIURA et al, 2001), gezeigt werden.

G-CSF ist ein endogenes glycosyliertes Polypeptid, das für seine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, besonders bei der Ausbildung der neutrophilen Zellreihe, bekannt ist (GABRILOVE, 1989; NICOLA, 1990; WELTE et al, 1988). G-CSF stimuliert die Proliferation, Differenzierung und Reifung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark (NICOLA, 1990; WELTE et al, 1988). Weiterhin bewirkt es eine gesteigerte antibakterielle Funktion der neutrophilen Granulozyten mit vermehrter Adhäsion, Migration, Phagozytose, Superoxid-Produktion und Antikörper-vermittelter Zytotoxizität (BONEBERG et al, 2002b; ROBERTS, 2005; WEISS et al, 1996). G-CSF moduliert außerdem die Zytokinantwort in der Entzündungsreaktion mit einer verminderten Freisetzung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (BONEBERG et al, 2002a).

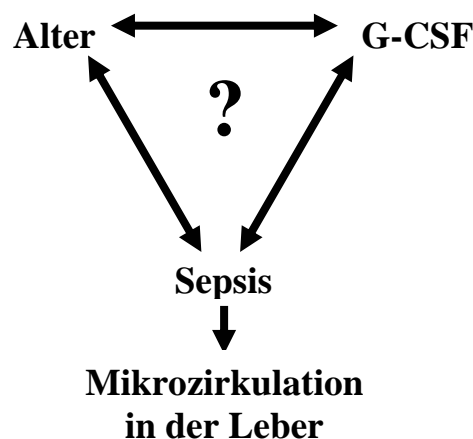
In der Zwischenzeit konnte in einer Vielzahl an tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass das Outcome im Sepsismodell durch G-CSF Gabe verbessert wird. (BARSIG et al, 1996; BUSCH et al, 2004; EICHACKER et al, 1994; FINK et al, 1993; HABERSTROH et al, 1995; VOLLMAR et al, 1997). Weiterhin deutet auch der klinische Einsatz auf die antiinflammatorische Wirkung und die supportive Rolle von G-CSF in der Immunantwort des nicht neutropenischen Patienten auf der chirurgischen Intensivstation hin. (AZOULAY et al, 2004; GROSS-WEEGE et al, 1997; GRUSON et al, 2000).

Vermittelt wird eine direkte G-CSF-Wirkung über einen transmembranständigen Rezeptor (G-CSFR) (WEISS et al, 1999). Dieser Rezeptor befindet sich auf neutrophilen Granulozyten, auf deren Vorläuferzellen im Knochenmark und Monozyten, aber auch auf Thrombozyten, Endothelzellen und in der Placenta, jedoch nicht auf Lymphozyten und

eosinophilen Granulozyten (BONEBERG et al, 2000; BONEBERG et al, 2002b). Die Expression des G-CSF Rezeptors wird durch G-CSF verstärkt, durch TNF-alpha und LPS vermindert (BONEBERG et al, 2000; BONEBERG et al, 2002b).

### 3.7. Alter – G-CSF – Sepsis

Der exakte physiologische bzw. pathophysiologische Mechanismus, der für die beeinträchtigte Immunkfunktion und erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen im Alter verantwortlich ist, bleibt unklar. Bekannt ist jedoch eine erhöhte Morbidität und Mortalität älterer Individuen in der Sepsis.



**Abbildung 4:** Unklarer Zusammenhang zwischen Alter, G-CSF, Sepsis und hepatischer Mikrozirkulation

Auch ist der Stellenwert der adjuvanten G-CSF-Therapie in der Endotoxinämie und Sepsis in der Klinik noch nicht eindeutig geklärt. Zwar scheint bei Kindern G-CSF in der Sepsis ein verbessertes Outcome zu bewirken (CARR et al, 2003), jedoch konnte ein eindeutiger positiver klinischer Effekt bei erwachsenen Patienten in der Sepsis noch nicht nachgewiesen werden (AZOULAY et al, 2004; WIEDERMANN et al, 2001). Bei der heterogenen Alterszusammensetzung der Patienten im Erwachsenenalter wäre eine mögliche

---

Erklärung für dieses Phänomen eine mit zunehmendem Alter abgeschwächte oder veränderte Reaktion des Immunsystems auf das immunmodulierende Agens G-CSF.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in einem altersgestaffelten tierexperimentellen Sepsismodell bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl physiologischer Parameter der hepatischen Mikrozirkulation zu erfassen (VOLLMAR et al, 1998a). So kann nicht nur eine Organschädigung durch entweder Alter oder Endotoxinämie in der Leber quantifiziert, sondern auch der Mechanismus dieser Schädigung durch eine Analyse der Leukozytenaktivität analysiert werden.

Da jedoch auch über die hepatische Mikrozirkulation und deren Veränderungen im Alter wenig bekannt ist, müssen in vorausgehenden Experimenten altersabhängige Veränderungen der Funktionseinheit Leber vor allem im Bereich der Leberfunktion, Lebergeometrie und der hepatischen Mikrozirkulation analysiert werden.

## 4. Ziel der Studie

### 4.1. Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde in einem altersgestaffelten Tiermodell der Einfluß von Alter und G-CSF in einer durch LPS induzierten Sepsis auf die hepatische Mikrozirkulation und der dort zu beobachtenden Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die systemische Zytokinfreisetzung detailliert analysiert. Da keine Daten für die von uns erhobenen Parameter in alleiniger Abhängigkeit von zunehmendem Alter vorlagen, wurden diese von uns in einer primären Untersuchung erhoben.

Von besonderem Interesse waren dabei folgende Fragen:

- Gibt es im Tiermodell physiologische altersabhängige Unterschiede der Lebersyntheseleistung, der Lebermorphologie oder der Lebermikrozirkulation?
- Gibt es im Tiermodell physiologische altersabhängige Unterschiede in der Phagozytoseaktivität sessiler Makrophagen oder der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber?
- Wie werden diese physiologischen altersabhängigen Veränderungen der Leber durch Endotoxinämie modifiziert?
- Ist die Zytokinantwort nach Endotoxinämie in den Altersgruppen vergleichbar?
- Wirkt die Vorbehandlung mit G-CSF vor Endotoxinexposition in allen Altersgruppen protektiv auf die hepatische Mikrozirkulation?
- Wie verändert sich die Lebersyntheseleistung und die Phagozytoseaktivität sessiler Makrophagen in der Leber nach Vorbehandlung mit G-CSF und Endotoxinämie?
- Wie verändert sich die Zytokinantwort nach Endotoxinämie unter G-CSF-Vorbehandlung?

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 78 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Wiga, Sulzfeld) im Alter von 1 Monat bis 24 Monaten. Das Körpergewicht der Tiere betrug 56g (1-Monatstier) - 948g (12-Monatstier). Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 70%) in der Versuchstierhaltung der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. M. Cybik) gehalten. Während ihrer Haltung bekamen die Versuchstiere Standardlaborfutter (Altromin, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage) und Wasser ad libitum. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen, während das Trinkwasser bis zu Versuchsbeginn frei zugänglich blieb.

### 5.2. Modell

#### 5.2.1. Vorbehandlung und Anästhesie

In leichter Äthernarkose (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main) erfolgte, nach Wiegen des Versuchstieres, die intravenöse Injektion von G-CSF (200µg/kg KG; Filgrastim, Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) bzw. NaCl 0,9% über die Vena dorsalis penis mittels einer 1ml-Spritze und einer Kanüle der Größe 17GA. 1 Stunde später erfolgte wiederum in leichter Äthernarkose die intravenöse Injektion von *Escherichia coli* Lipopolysaccharid (LPS; 10mg/kg KG; Serotyp 0128:B12). Jeweils nach Erwachen aus der Äthernarkose wurde das Versuchstier bis zur Weiterbehandlung oder Induktion der für die chirurgische Präparation notwendigen Narkose wieder im Käfig mit freiem Zugang zu Trinkwasser belassen.



### 5.2.2. Anästhesie und chirurgische Präparation

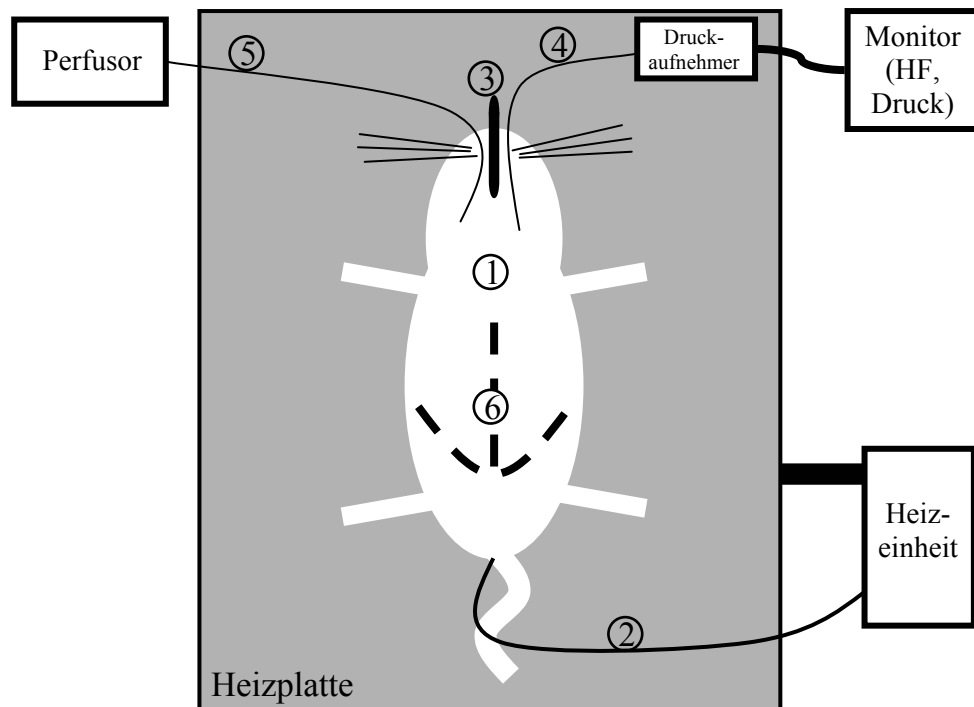
Die intraperitoneale Applikation von Narcoren® (Pentobarbital; 50mg/kg KG) erfolgte ebenfalls in leichter Äthernarkose. Nach der Rasur von Hals- und Bauchregion (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen) wurden die Tiere in Rückenlage mittels Pflasterstreifen auf einem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Effenberger, Pfaffing/Attel) fixiert, welche durch Rücksteuerung mit einer rektalen Temperatursonde erlaubte, die Körpertemperatur der Versuchstiere zwischen 36° und 37°C konstant zu halten (Abb. 5). Die anschließend durchgeführte Tracheotomie diente zur Erleichterung der unter der Anästhesie mit Pentobarbital noch erhaltenen Spontanatmung. Nach Darstellung der Arteria carotis communis sinistra und Anschlingen des Gefäßes mit Fäden der Stärke 6.0 konnte über eine Inzision der Arterienwand ein spitz angeschrägter Polyethylenkatheter (PE-50, 800/110/200, Innendurchmesser: 0,58mm, Außendurchmesser: 0,96mm; Portex Ltd., Hythe, England) in das Gefäßlumen eingeführt und mit den vorgelegten Fäden fixiert werden. Der arterielle Katheter wurde über Dreiwegehähne an ein Druckspülsystem (Injectomat S; Fresenius, Schweinfurt) angeschlossen. Die kontinuierliche Spülung mit 0,9% Kochsalzlösung (2ml/kg/h; Clintec Salvia, Homburg/Saar) verhinderte die Okklusion des Katheters durch Thrombenbildung. Der Katheter diente der kontinuierlichen Kontrolle von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck. Außerdem erfolgten über diesen Zugang auch Blutabnahmen für Blutbild und arterielle Blutgasanalyse.

Entsprechend wurde die V. jugularis externa dextra in der rechten Fossa supraclavicularis aufgesucht und nach Technik der Venae sectio katheterisiert. Der venöse Zugang erlaubte die Injektion der zur Intravitalmikroskopie notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe und Narcoren® zur weiteren kontinuierlichen Anästhesie.

Nach querer Laparotomie erfolgte die Resektion des Omentum minus sowie der Haltebänder der Leber (Ligg. falciforme hepatis, teres hepatis, triangularia dextra und sinistra) zur besseren Mobilisierung der Leber.

Nach Darstellung der V. portae, der A. hepatica und des Ductus choledochus im Ligamentum hepatoduodenale wurde der Ductus choledochus mit Fäden der Stärke 6-0 angeschlungen, und es konnte über eine Inzision der Ductuswand ein spitz angeschrägter Polyethylenkatheter (PE-50, 800/110/200, Innendurchmesser: 0,58mm, Außendurchmesser: 0,96mm; Portex Ltd., Hythe, England) in das Ductuslumen eingeführt und mit den

vorgelegten Fäden fixiert werden. Über diesen Katheter konnte die hepatische Produktion von Galle quantitativ erfaßt werden.



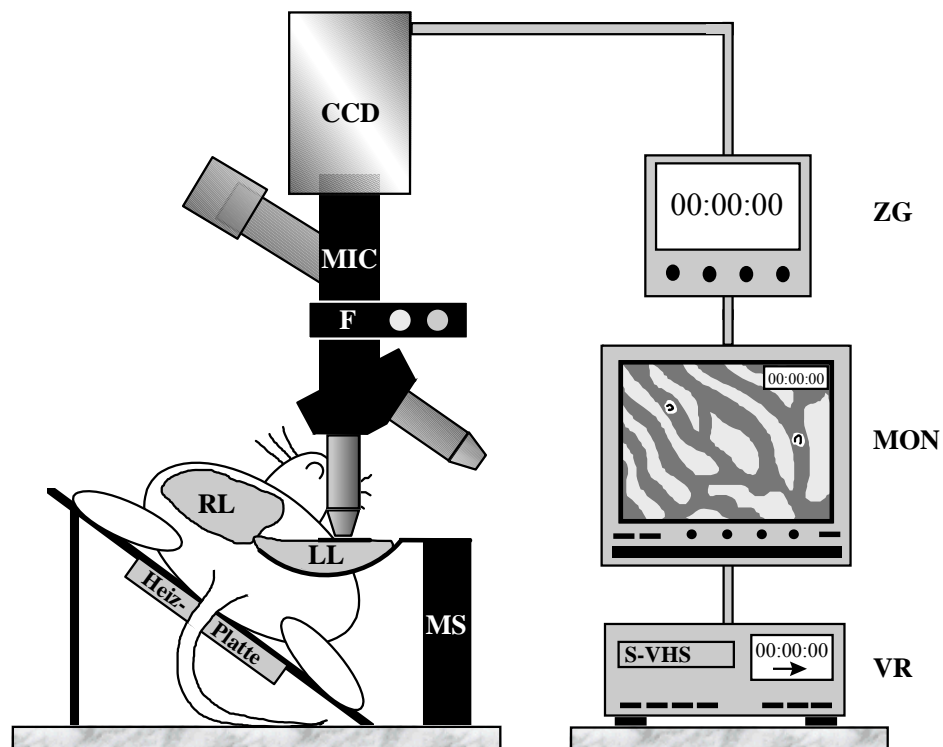
**Abbildung 5:** Schematischer Versuchsaufbau während der Phase der Präparation mit 1=Versuchstier in Rückenlage, 2=rektale Temperatursonde, 3=Trachealkanüle, 4=arterieller Katheter in der A. carotis sinistra, 5=venöser Katheter in der V. jugularis dextra, 6=Schnittführung der Laparotomie.

Das gesamte Intestinum wurde mit einer kleinen angefeuchteten Mullkompressen abgedeckt und regelmäßig mit warmer Kochsalzlösung gespült, um eine Austrocknung und Abkühlung der Baueingeweide zu vermeiden.

### 5.2.3. Mikrozirkulationsuntersuchung der Leber

Zur Vorbereitung der Intravitalmikroskopie wurde der Operationstisch mit dem Versuchstier um 30° in der Horizontalen nach links gekippt. Der linke Leberlappen wurde unter Zuhilfenahme angefeuchteter Wattestäbchen an seinem Gefäßstiel in Uhrzeigerrichtung

rotiert, mit der Oberseite auf einem genau der Größe und Wölbung der Leberoberfläche angepassten Plastilinbett in einer Metallschale eines Metallstativs gelagert, mit 37° C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung (Clintec Salvia, Homburg/Saar) befeuchtet und mit einem Deckglas (24×32 mm) versehen. Das in drei Ebenen verstellbare Magnetstativ erlaubt die plane Oberfläche des linken Leberlappens weitgehend unabhängig von den Atemexkursionen des Versuchstieres parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren (VOLLMAR et al, 1994a). Durch diese Auslagerung des linken Leberlappens konnte während der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eine Fläche von etwa 2cm × 3cm visualisiert werden, welche morphologisch ungefähr 2000 Leberazini entspricht.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Das Versuchstier liegt auf dem 30° geneigten Operationstisch, in den eine Heizplatte integriert ist. Der linke Leberlappen (LL) ist auf eine, an einem Magnetstativ (MS) befestigte Metallschale ausgelagert und mit einem Deckgläschen (24×32 mm) versehen. Das verstellbare Stativ erlaubt, die plane Oberfläche des linken Leberlappens nahezu frei von Atemexkursionen parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren. RL = rechter Leberlappen, MIC = Mikroskop, CCD = CCD-Videokamera, F = Filterblöcke, ZG = Video-Zeit-generator; MON = Bildschirm; VR = S-VHS-Videorecorder.

#### 5.2.4. Probenasservierung für Vollblut- , Serum- und Plasmaanalysen

Intraoperativ wurde in regelmäßigen Intervallen über den in der A. carotis communis dextra liegenden Katheter Vollblut für Blutgasuntersuchungen und Blutbild entnommen.

Zum Versuchsende nach Abschluß der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde die Aorta des Versuchstieres mit einer Nadel Größe 17GA punktiert und dem Tier ca 3-4 ml Vollblut entnommen (1ml ohne EDTA, 3 ml mit EDTA). Das Blut wurde hierfür in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen) für 10 Minuten bei 4°C und 3600 U/min zentrifugiert, das Serum bzw. Plasma abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

#### 5.2.5. Probenasservierung zur Vitamin A-Bestimmung im Leberparenchym

Nach aortaler Blutentnahme wurde die Leber nach Durchtrennung der V. porta, der A. hepatica, des Ductus choledochus und der Vv. hepaticae in toto entnommen und nach Gewichtsbestimmung teils in flüssigem Stickstoff (Normalsiedepunkt : – 196°C) gefrosten und anschließend bei - 70°C gelagert oder zur histologischen Aufbereitung in Formalin 4% fixiert.

Durch den hieraus resultierenden Blutverlust bzw. die hierdurch verursachte Luftembolie verstarben die Versuchstiere in tiefer Pentobarbital Narkose innerhalb kürzester Zeit (< 1 Minute).

## 5.3. Untersuchungstechniken

### 5.3.1. Makrohämodynamik

Der arterielle Zugang war über einen Druckaufnehmer (Statem Typ P23 ID; Gould Inc., Oxnard, California, USA) mit einem analogen Meßgerät (Servomed, Hellige, Freiburg/Breisgau) und einem Flachbrettschreiber (Linear Corder Mark VII, Watanabe, Herrsching/Ammersee) verbunden. Neben der kontinuierlichen Registrierung des mittleren arteriellen Blutdrucks (Schreibergeschwindigkeit 5 mm/min) erfolgte zusätzlich intermittierend die Ermittlung der Herzfrequenz anhand des Abstandes der Blutdruckamplituden (Schreibergeschwindigkeit 500 mm/min).

### 5.3.2. Mikrozirkulation

#### 5.3.2.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Farbstoffe

6 Stunden nach LPS-Injektion erfolgte die Intravitalmikroskopie zur Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Hierzu diente ein modifiziertes Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe. Unterschiedliche Filterblöcke entsprechend der Fluoreszenz der gewählten Farbstoffe bzw. der zu beobachtenden Autofluoreszenz konnten in den Strahlengang eingebracht werden und zwar für Natrium-Fluoreszein (Filterblock Nr.09, Erregungswellenlänge: 450-490nm, Emissionswellenlänge: >515nm; Leitz, Wetzlar), für die Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen (Filterblock Nr.02, Excitationswellenlänge: 330-390nm, Emissionswellenlänge: >430nm; Zeiss, Oberkochen) und für Rhodamin-6G (Filterblock Nr.15, Erregungswellenlänge: 530-560nm, Emissionswellenlänge: >580nm; Leitz, Wetzlar). Die mikroskopischen Bilder wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit 10-2 lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) aufgenommen und über einen Bildschirm (33 cm Bildschirmdiagonale; PVM-1444 QM, Sony, München) an einen S-VHS-Videorecorder mit einer Aufzeichnungsrate von 50 Bildern pro Sekunde (AG-7350, Panasonic, Ratingen) weitergeleitet. Ein zwischen Videokamera und Bildschirm geschalteter Video-Zeitgenerator

(VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) diente zur gleichzeitigen Einblendung und Aufnahme der Zeit in Minuten, Sekunden und Hundertstel-Sekunden (Abb. 6).

Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 10\* Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10\*/0.30, Zeiss, Oberkochen), für alle weiteren Aufnahmen zur quantitativen Analyse der hepatischen Mikrozirkulation ein 20\* Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Achroplan 20\*W /0.50, Zeiss, Oberkochen) eingesetzt. Mit den verwendeten Objektiven konnte eine 360fache bzw. 730fache Gesamtvergrößerung auf dem Bildschirm der Aufnahmeeinheit erzielt werden (Abb. 6).

Zur besseren Kontrastierung wurde zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen Natrium-Fluoreszein (2  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht i.v.; MG 376; Merck, Darmstadt) injiziert. Bei blauer Auflichtmikroskopie (Filterblock Nr. 09) konnte so die sinusoidale Perfusion untersucht werden. Nach dem Wechsel des Filters auf den Filterblock Nummer 02 mit einer Emissionswellenlänge von  $> 430\text{nm}$  konnten dann in dem schon fokussierten Gesichtsfeld die Anzahl, die Verteilung und die Fluoreszenzdauer der hepatischen Sternzellen bestimmt werden. Mit Hilfe eines Filtersystems für grünes Licht (Filterblock Nr 15) konnte nach *in vivo*-Markierung der Leukozyten mit Rhodamin-6G (0,1  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht i.v.; MG 302; Merck, Darmstadt) das Leukozytenfließverhalten und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfasst werden.

Es wurden randomisiert insgesamt 10 Gesichtsfelder ausgewählt und für jeweils 20 bis 30 Sekunden in jedem der drei Filter mikroskopiert und aufgezeichnet. Die Gesichtsfelder wurden fokussiert und so eingestellt, dass die den Azinus bildenden Sinusoide auf ihrer gesamten Länge gut visualisierbar waren.

Anschließend wurden je 10 postsinusoidale Venolen für 30 Sekunden sowohl mit dem Filterblock Nr. 09 als auch mit dem Filterblock Nr. 15 mikroskopiert und aufgezeichnet.

Zur abschließenden Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen wurden fluoreszierende Latex-Partikel (1,1 $\mu\text{m}$  Durchmesser; Polysciences Inc., Warrington, PA) über den in der A. carotis communis liegenden Katheter intraarteriell als Bolus verabreicht (3 x  $10^8/\text{kg}$  in 1ml isotonischer Kochsalzlösung). Sowohl ihre Anflutung im Azinus als auch ihre Stagnation in den Lebergefäßen wurden aufgenommen (POST et al, 1992; VOLLMAR et al, 1994b). Zu diesem Zweck wurde über eine Gesamtdauer von ca. 5-7 Minuten alle 10 Sekunden ein anderes Gesichtsfeld ausgewählt und aufgezeichnet. Dabei wurde das unter dem

Deckglas sichtbare Leberparenchym meanderförmig mikroskopiert. Ein Durchmesser von  $1.1\mu\text{m}$  wurde bewusst ausgewählt, da sich gezeigt hat, dass Partikel mit einem Durchmesser von größer  $0.8\mu\text{m}$  bevorzugt von Kupfferzellen phagozytiert werden (DAN et al, 1985). Im Anschluß daran wurden nochmals 10 Azini ausgewählt und für 5 Sekunden aufgezeichnet, um das intraazinäre Verteilungsschema der durch Phagozytose mit den Latex-Partikel markierten Kupfferzellen zu bestimmen.

### 5.3.2.2. Auswerteeinheit

Die off-line Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte unter Zuhilfenahme computergestützter Bildverarbeitung. Die Einheit setzte sich aus einem Standard-PC (Intel 386/33, 4MB DRAM, 1MB Graphikkarte, DOS-Betriebssystem) mit Video/Overlay-Karte (Matrox, IP8-AT/2MC, Moores/NY, USA), einem 15-Zoll-Monitor und einem hochauflösenden Farbmonitor (PVM 1371-QM; Sony Corp., Tokio, Japan) zur Bildanalyse zusammen. Als Bearbeitungssoftware kam das Bildanalysesystem CapImage (Version 5.03, Zeintl Software Engineering, Heidelberg) zur Anwendung (KLYSCZ et al, 1997; ZEINTL et al, 1986).

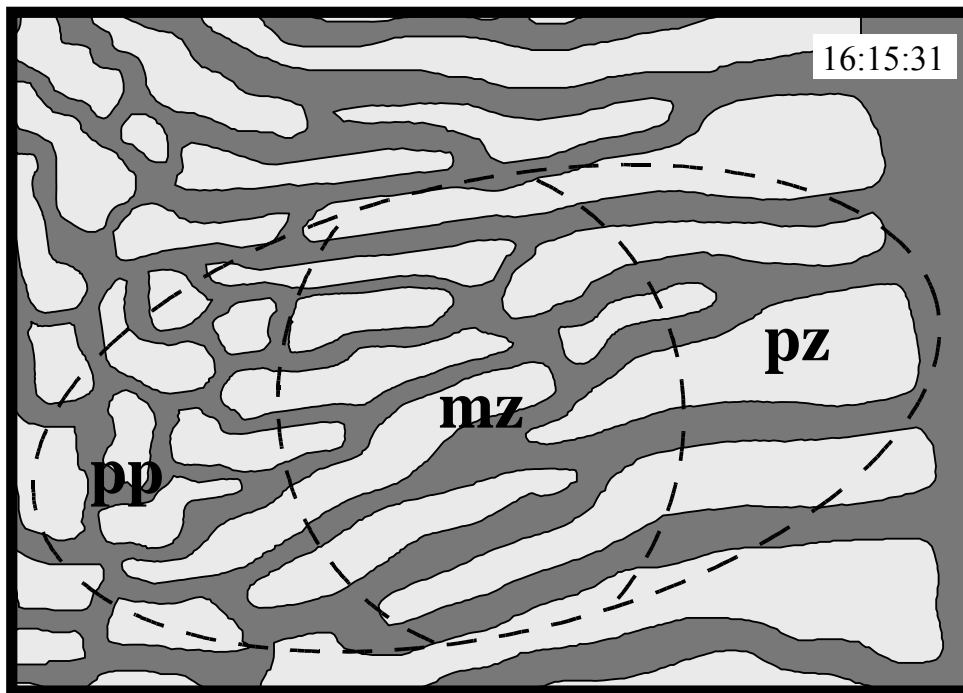
### 5.3.3. Mikrozirkulatorische Parameter

Die Analyse der mikrozirkulatorischen Untersuchungsparameter erfolgte anhand des während des Versuches aufgenommenen Videobandmaterials. Pro Versuchstier kamen für jeden Parameter jeweils 10 - 15 verschiedene Bildausschnitte zur Auswertung.

In allen Tiergruppen erfolgte die Auswertung der Lebergeometrie, der hepatischen Mikrozirkulation und des leukozytären Fließverhaltens off-line, d.h. nach Versuchsende anhand der Videoaufnahmen mittels Bild-zu-Bild-Analyse.

Um innerhalb der einzelnen Aufnahmen vergleichbare Auswertebedingungen zu schaffen, mussten aus den auf dem Bildschirm sichtbaren Gesichtsfeldern jeweils

vergleichbare Regionen der hepatischen Mikrozirkulation ausgewählt werden. Dies erfolgte für die azinäre Analyse, indem durch eine auf die Bildschirmoberfläche gelegte Schablone ein Areal auszuwertender Sinusoide festgelegt wurde (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Prinzip der off-line-Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Dargestellt ist die Videoaufnahme eines Azinus auf dem Bildschirm, über den eine elliptische Schablone gelegt wurde (gestrichelte Linien; zur Verdeutlichung der zonalen Unterteilung wurden die Bezeichnungen pp = periportal, mz = midzonal und pz = perizentral in dieser Abbildung zusätzlich eingetragen). Oben rechts im Bild das eingblendete Signal des Video-Zeitgebers.

Da die Sinusoide innerhalb der verschiedenen Gesichtsfelder verschiedene Längen aufwiesen und eine wichtige Auswertebedingung die Erfassung eines Sinusoids über seine gesamte Länge war, kamen verschieden große Schablonen zur Anwendung. Diese besaßen alle eine elliptische Struktur, da das exakte hexagonale Muster des klassischen Zentralvenenläppchens in Wirklichkeit eher selten anzutreffen ist, und eine ovale Form dem durchschnittlichen architektonischen Aufbau der Azini am nächsten kommt (RAPPAPORT, 1958) (Abb.7). Die Erhebung der einzelnen Parameter erfolgte entsprechend der subazinären Unterteilung in periportale, midzonale und perizentrale Segmente (RAPPAPORT, 1973). Diese topographische Einteilung in drei Zonen gleicher Länge geht auf eine Unterscheidung



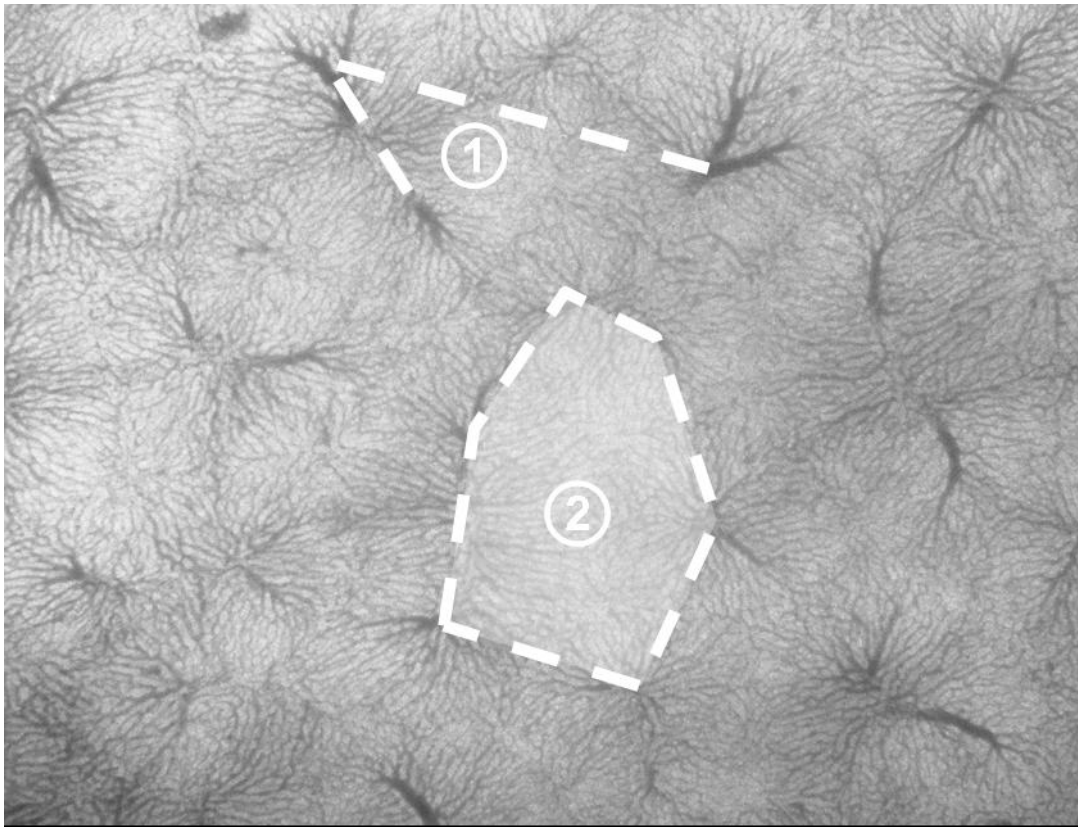
der Hepatozyten hinsichtlich der unterschiedlichen Enzymausstattung, Stoffwechselaktivität und Organellen-verteilung entlang des Verlaufs der Sinusoide zurück (JUNGERMANN et al, 1989).

### 5.3.3.1. Lebergeometrie

Die Bestimmung der einfachen azinären Fläche, der komplexen azinären Fläche, des venulo-venösen Abstandes, der venulären Fläche, der venulären Länge und des sinusoidalen Durchmessers als Maß für die Lebergeometrie erfolgte in nicht vorbehandelten Versuchsgruppen. Off-line wurden an der PC-gestützten Auswerteeinheit Strecken durch Festlegen der beiden Endpunkte und Flächen durch Umfahren der der Strukturen markiert und mit Hilfe der Analysesoftware CapImage berechnet.

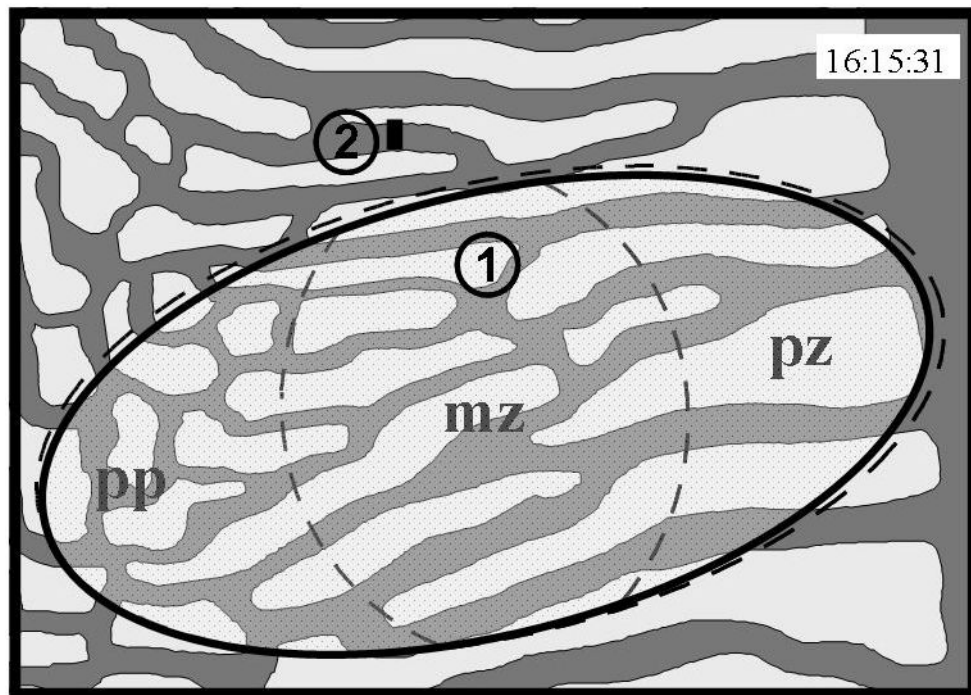
Die Bestimmung des venulo-venulären Abstandes und der Größe der komplexen Azini, der einer Zusammensetzung aus 6 einfachen Azini entspricht, die um ein zuführendes Gefäß angeordnet sind (RAPPAPORT, 1973), erfolgte in Übersichtsaufnahmen mit einem 10\* Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10\*/0.30, Zeiss, Oberkochen) und einem daraus resultierenden Vergrößerungsfaktor von 360 (Kontrastierung mit Natrium-Fluoreszein zur Kontrastverstärkung (siehe 5.3.2.1) und Nutzung des Filterblockes Nr. 09, (Erregung 450-490nm; Emission >515nm)). Die Auswertung erfolgte off-line wie bereits beschrieben und ist schematisch in Abbildung 8 zu sehen.

Die Bestimmung der einfachen azinären Größe und des sinusoidalen Durchmessers erfolgte dementsprechend in vergleichbaren Aufnahmen, die jedoch mit einem 20\* Objektiv und einer daraus resultierenden 730fachen Vergrößerung aufgenommen wurden (Abb. 9).



**Abbildung 8:** Prinzip der off-line-Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Dargestellt ist die Videoaufnahme einer Übersichtsaufnahme nach Kontrastverstärkung mit Natrium-Fluoreszein, der Nutzung eines 10x Objektives und des Filterblocks Nr. 09. Eingezeichnet und markiert mit 1 die Auswertung des venulo-venulären Abstandes und mit 2 ein komplexer Azinus.

In Aufnahmen der postsinusoidalen Venolen wurde vergleichbar die venuläre Länge und die sichtbare Fläche der entsprechenden postsinusoidalen Venole markiert und per Computeranalyse berechnet. Als Anfangspunkt der Markierung der postsinusoidalen Venole wurde der Punkt markiert, an dem 3 oder mehr Sinusoide konvergierten; an der Stelle, an dem die Venole in die Tiefe des Lebergewebes verschwand, wurde der Endpunkt der Venole markiert.



**Abbildung 9:** Prinzip der off-line-Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Dargestellt ist die Videoaufnahme einer Übersichtsaufnahme nach Kontrastverstärkung mit Natrium-Fluoreszein, der Nutzung eines 20x Objektivs und des Filterblocks Nr. 09. Eingezeichnet und markiert mit 1 die Auswertung der Fläche eines einfachen Azinus und mit 2 eines sinusoidalen Durchmessers.

### 5.3.3.2. Sinusoidale Dichte und Perfusionsrate

Die sinusoidale Dichte und die sinusoidale Perfusionsrate wurde nach Negativkontrastierung mit Natrium-Fluoreszein bestimmt. Wie oben beschrieben wurde durch eine auf die Bildschirmoberfläche gelegte Schablone ein Areal auszuwertender Sinusoide festgelegt, entsprechend einem einfachen Azinus (RAPPAPORT, 1958), wobei wiederum die Unterteilung des azinären Segments in periportale, midzonale und perizentrale Regionen erfolgte. Midzonal wurde eine 200 µm große Strecke, die orthogonal zur Längsachse der Ellipse steht, markiert. Definiert wurde die sinusoidale Dichte als die Anzahl der diese Strecke überschreitenden Sinusoide (Anzahl der Sinusoide /200µm).

$$\text{Sinusoidale Dichte (N/200}\mu\text{m)} = \frac{\text{Alle Sinusoide über 200}\mu\text{m midzonal}}{200\mu\text{m midzonal}}$$

Weiterhin wurden von diesen Sinusoiden alle perfundierten Sinusoide gezählt und im Verhältnis zur Gesamtzahl angegeben. Dabei galten Sinusoide als perfundiert, wenn diese von Erythrozyten oder Leukozyten im Beobachtungszeitraum durchflossen wurden. Das Verhältnis der perfundierten Sinusoide zur Gesamtzahl der Sinusoide midzonal über 200  $\mu\text{m}$  wurde als Prozentzahl angegeben und als sinusoidale Perfusionrate bezeichnet.

$$\text{Perfusionsrate (\%)} = \frac{\text{Perfundierte Sinusoide über 200}\mu\text{m midzonal}}{\text{Alle Sinusoide über 200}\mu\text{m midzonal}} \times 100$$

### 5.3.3.3. Blutzellgeschwindigkeit und volumetrischer Blutfluss

Einen weiteren wichtigen Parameter mit Aussage über die Mikrohämodynamik im Bereich der Leberperfusion stellt die Blutzellgeschwindigkeit in den Sinusoiden ( $V_{\text{sinusoidal}}$ ) dar. Diese wurde midzonal ( $\mu\text{m} / \text{Sekunde}$ ) bestimmt. Nachdem die Durchmesser (DS) der entsprechenden Sinusoide bestimmt worden waren (siehe 5.3.3.2), wurde fünf mal pro Gesichtsfeld die über einen gemessenen Beobachtungszeitraum zurückgelegte Strecke der sichtbaren korpuskulären Blutbestandteile erfasst und so die sinusoidale Blutzellgeschwindigkeit mit Hilfe der Formel

$$v = \frac{s}{t}$$

bestimmt.

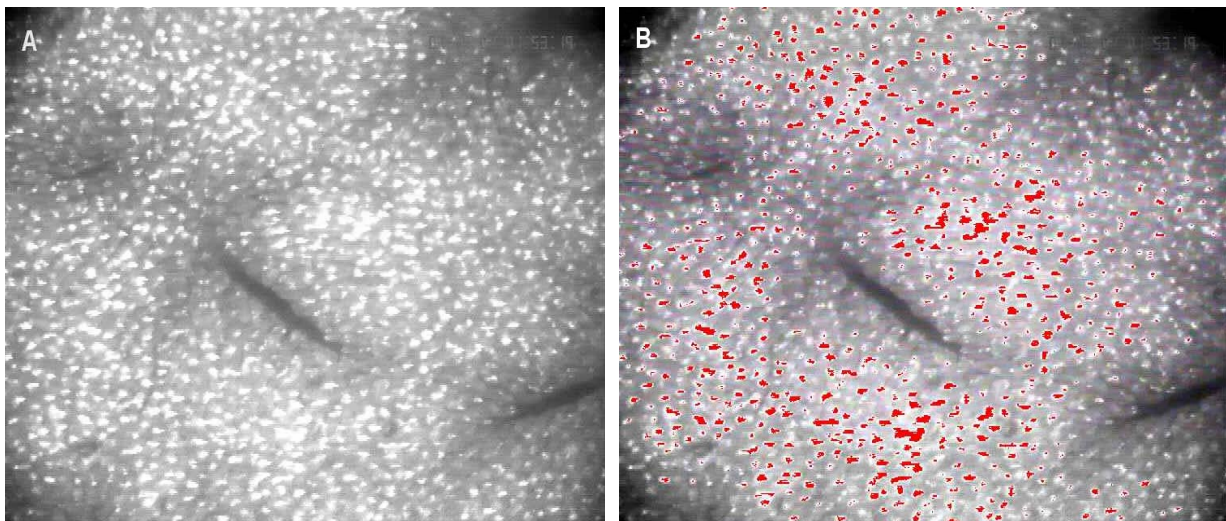
Weiterhin wurde aus den erhobenen Daten der volumetrische Blutfluss (VQ) [pl / Sekunde] unter Anwendung der Gleichung von Gross and Aroesty (GROSS et al, 1972) errechnet:

$$VQ = V_{\text{sinusoidal}} * \pi * \left( \frac{DS}{2} \right)^2$$

Mit  $\pi \times (DS/2)^2$  wird der mikrovaskuläre Querschnitt bestimmt. Es muss jedoch beachtet werden, dass für diese mathematische Berechnung eine zylindrische Form der Sinusoide vorausgesetzt wird, die anatomisch wahrscheinlich nicht immer gegeben ist. Daher entspricht der berechnete Blutfluss nur näherungsweise dem tatsächlichen Blutfluss. Da diese Näherung bei allen bestimmten Werten des sinusoidalen Blutflusses jedoch vergleichbar zum Tragen kommt, sind die Vergleiche der errechneten Werte untereinander dennoch aussagekräftig.

#### 5.3.3.4. Analyse der hepatischen Sternzellen

Die Bestimmung der Fläche der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen und deren Anzahl erfolgte anhand der Nativaufnahmen mit UV-Filter (Filterblock Nr. 02) und 360-facher Vergrößerung. Die Vitamin A-abhängige Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen (SUEMATU et al, 1993) im UV-Licht erlaubte eine Quantifizierung der Zellzahl respektive des Vitamin A-Gehaltes mittels computergestützter off-line Analyse. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zu Beginn der Aufnahme nach Identifizierung des Azinus und Zuordnung der Zonen periportal, midzonal und perizentral die sichtbaren Fluoreszenzen zonengetrennt ausgezählt. Nach Größenbestimmung der unterschiedlichen Zonen im Azinus konnten die ausgezählten Zellen in Zellen pro mm<sup>2</sup> angegeben werden. Bei der Bestimmung der Fläche der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen wurde über eine Grauwertskala die Helligkeit der fluoreszierenden Bereiche zu Beginn der UV-Bestrahlung bestimmt und deren Fläche nach Implementierung einer adäquaten Grauwertschwelle in Prozent des Gesamtgesichtsfeldes berechnet (Abb. 10).



**Abbildung 10:** (A) Intravitalmikroskopische Aufnahme der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz der Ito-Zellen einer gesunden Leber. (B) Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz. Mittels computergestützter off-line-Analyse wurde über eine Grauwertskala die Helligkeit der fluoreszierenden Bereiche zu Beginn der UV-Bestrahlung bestimmt und die entsprechende Fläche rot markiert. Errechnet wurde dann der Anteil der markierten Fläche in Prozent des Gesamtgesichtsfeldes.

Das Abbleichen der hepatischen Sternzellen (Photobleaching) erfolgte unter kontinuierlicher Bestrahlung mit UV-Licht (Filterblock Nr.02). Dabei nimmt die Vitamin A-abhängige Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen beständig ab. In normalem Lebergewebe ist bereits nach einer Zeit von ca. 20 Sekunden keine Autofluoreszenz mehr in Ito-Zellen nachweisbar (SUEMATSU et al, 1993). In Nativaufnahmen mit UV-Filter und 360-facher Vergrößerung ermittelten wir unter konstanter UV-Lichteinwirkung die Dauer der Helligkeitsabnahme bis hin zum kompletten Fluoreszenzverlust anhand des eingblendeten Zeitgebers (Abb.11). Die Angabe erfolgte in Sekunden, wobei der Beobachtungszeitraum maximal 60 Sekunden betrug.



**Abbildung 11:** Abbleichen der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen einer gesunden Leber unter kontinuierlicher Bestrahlung mit UV-Licht. (A) Intravitalmikroskopische Aufnahmen zum Zeitpunkt des Beginns der Mikroskopie mit dem UV-Filter. Bereits nach 3 Sekunden ist eine deutliche Abnahme der Autofluoreszenz zu verzeichnen (B), welche nach 7 Sekunden nicht mehr nachweisbar ist (C). Anhand des eingeblendeten Zeitgebers wurde die Zeit der Helligkeitsabnahme vom Beginn der UV-Bestrahlung bis hin zum kompletten Fluoreszenzverlust der Ito-Zellen ermittelt.

### 5.3.3.5. Sinusoidales Leukozytenfließverhalten

Die Bestimmung des Fließverhaltens der Leukozyten in den Sinusoiden der Leber beinhaltet die Bestimmung der Anzahl der fließenden, der temporär stagnierenden und der dauerhaft stagnierenden Leukozyten pro Zeiteinheit. Diese Analyse wurde off-line in Aufnahmen der Mikroskopie ausgewertet, in denen die Leukozyten mittels Rhodamin-6G intravital angefärbt worden waren (Filterblock Nr. 15).

Die Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion umfasste erstens diejenigen Leukozyten, die sich während der Beobachtungszeit von 20 Sekunden bewegten, d.h. einen Sinusoid durchflossen. Die Auswertung unter Berücksichtigung der periportal, midzonal und perizentralen Region bedingte, dass ein fließender Leukozyt in jedem der drei Segmente einzeln gezählt wurde. Aus diesen Gründen entsprechen die Werte der ermittelten fließenden Leukozyten nicht der tatsächlichen Leukozytenzahl, da ein beliebiger den Sinusoid passierender Leukozyt aufgrund der zonalen Unterteilung mehrfach registriert wurde. Die Einteilung der fließenden Leukozyten erfolgte in frei-fließende Leukozyten (ohne zeitlich messbaren Kontakt zum sinusoidalen Endothel), Leukozyten mit einem Endothel-Kontakt von

kurzer Dauer (unter 1 Sekunde) und solche mit längerdauerndem Endothel-Kontakt (zwischen 1 und 20 Sekunden).

Neben den fließenden Leukozyten wurden die dauerhaft stagnierenden Leukozyten erfasst. Diese wurden definiert als intrasinusoidal gelegene und durch Rhodamin-6G angefärbte Zellen ohne Bewegung während des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden. Auch dieser Parameter wurde periportal, midzonal und perizentral getrennt erhoben.

### 5.3.3.6. Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Nach Kontrastierung mit Rhodamin-6G konnte analog zur Auswertung des Leukozytenfließverhaltens in Sinusoiden die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postsinusoidalen Venolen bestimmt werden.

Bestimmt wurden die Anzahl der freifließenden, der rollenden und der dauerhaft adhärennten Leukozyten. Als freifließend wurden die Leukozyten definiert, die über den in der Mitte der postsinuoidalen Venole gelegten Durchmesser ohne Kontakt mit dem Endothel und Verlangsamung ihrer Fließgeschwindigkeit flossen. Die Anzahl der freifließenden Leukozyten wurde jeweils über 20 Sekunden erfasst. Die Anzahl der rollenden Leukozyten, d.h. Leukozyten mit einer Geschwindigkeit von kleiner gleich  $2/5$  der Leukozytenfließgeschwindigkeit in der Mittellinie der Venole, wurde auf der gesamten Länge der Venole pro 20 Sekunden erfasst (angegeben in % der gesamten sich bewegenden Leukozyten pro 20 Sekunden). Die Anzahl der dauerhaft adhärennten Leukozyten, d.h. über den 20-sekündigen Beobachtungszeitraum sich nicht bewegenden Leukozyten, wurden im Verhältnis zur Mantelfläche der Venole angegeben (Leukozyten pro  $\text{mm}^2$ ). Die Mantelfläche der Venolenwand wurde unter der Annahme, dass die Venole einem Zylinder entspricht, aus Länge und Durchmesser mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Fläche}_{\text{Venolenwand}} = \text{Durchmesser}_{\text{Venole}} * \pi * \text{Länge}_{\text{Venole}}$$

Die Länge des zu untersuchenden Gefäßabschnittes wurde unter Zuhilfenahme einer  $200\mu\text{m}$ -Schablone manuell am Monitor bestimmt (VOLLMAR et al, 1994c). Der Gefäßdurchmesser wurde computergestützt ermittelt.



### 5.3.3.7. Kupfferzellaktivität und -verteilung

Die Quantifizierung der Aktivität der Kupfferzellen erfolgte an Aufnahmen in 730-facher Vergrößerung und unter Auflicht-Illumination mit blauem Licht (Filterset Nr. 09).

Nach Injektion der Latex-Partikel ( $3 \times 10^8/\text{kg}$  in 1ml isotoner Kochsalzlösung) wurde über 5 Minuten die Leberoberfläche mikroskopiert, wobei alle 10 Sekunden das fokussierte Gesichtsfeld meanderförmig verschoben wurde. Die jeweils im eingestellten Gesichtsfeld fließenden und stagnierenden Latex-Partikel wurden off-line gezählt, wobei stagnierende Latex-Partikel als phagozytiert gewertet wurden (POST et al, 1992; VOLLMAR et al, 1994b). Freifließende Latex-Partikel wurden zur Gesamtzahl der Latex-Partikel, also sowohl der freifließenden als auch der stagnierenden, ins Verhältnis gesetzt. Berechnet wurde die relative Anzahl der freifließenden Latex-Partikel:

Relative Anzahl frei fließender Latex-Partikel [%]

$$= (\text{freifließende Latex-Partikel} / \text{alle Latex-Partikel}) \times 100$$

Der so entstandene Zahlenwert zeigt in Abhängigkeit zur Zeit einen asymptotischen Verlauf mit 0% als Asymptote. Je früher sich die Kurve der Asymptote annäherte, desto größer war die Kupfferzellaktivität.

Nach Abschluss dieser Sequenz wurden dann die stagnierenden Latex-Partikel in nochmals 10 fokussierten azinären Gesichtsfeldern ausgezählt und sowohl als Absolutzahl im Bezug auf die azinäre Region (periportal, midzonal und perizentral) als auch als relative Anzahl pro  $\text{mm}^2$  in der entsprechenden Region angegeben.

### 5.3.4. Vollblut-, Serum- und Plasmaanalytik

#### 5.3.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, systemischer Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl

Zur Bestimmung der arteriellen Blutgase, des systemischen Hämatokritwertes und der systemischen Leukozytenzahl wurde den Versuchstieren jeweils nach Einlegen der Katheter vor Beginn der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung und zu deren Ende ca. 1ml Vollblut entnommen und durch Vollelektrolytlösung ersetzt. Die arterielle Blutgasanalyse (BGA) mittels eines Acid Base Analyzer (ABL 300; Radiometer, Copenhagen, Dänemark) umfasste pH-Wert, Kohlendioxidpartialdruck ( $\text{PaCO}_2$ ), Sauerstoff-partialdruck ( $\text{PaO}_2$ ), die Werte von Standardbikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Sauerstoffsättigung sowie den Basenüberschuss (base excess, BE). Die Analyse des systemischen Hämokrits erfolgte nach der Zentrifugation von Kapillarröhrchen (Micro-Haematocrit Centrifuge; Gelman Hawksley Ltd., London, England) unter Verwendung eines Ableselineals (Micro-Haematocrit Reader; Gelman Hawksley Ltd., London, England). Die Erfassung der systemischen Leukozytenzahl wurde automatisiert mit Hilfe eines Durchflussszytometers (CC 780; Sysmex, Kobe, Japan) durchgeführt.

#### 5.3.4.2. Laborchemische Untersuchung der Aktivität leberspezifischer Enzyme

Zu Versuchsende entnommenes arterielles Vollblut diente zur Bestimmung der Serumkonzentrationen der Leberenzyme Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alanin-Amino-Transferase (ALT), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Alkalische Phosphatase (ALP). Das Blut wurde hierfür in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen) für 10 Minuten bei 4° C und 3600 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -70° C gelagert. Die Bestimmungen der Enzyme erfolgte mit einem Automatic Analyzer Hitachi 717 (Boehringer, Ingelheim).

### 5.3.4.3. Zytokinbestimmung

Die Bestimmung der Zytokine und Chemokine erfolgte aus am Versuchsende gewonnenem Blutplasma, das bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Bestimmt wurden die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-4 (IL-4), sowie die Chemokine Rantes und Makrophagen inflammatorisches Protein-2 (MIP-2).

Die Analyse erfolgte mittels handelsüblicher „enzyme-linked immuno sorbent assays“ (ELISAs) für Ratten der Firma Biosource (Ratingen, Deutschland).

### 5.3.5. Bestimmung der Vitamin A-Konzentration im Lebergewebe

Die Bestimmung der Vitamin A-Konzentration und der Konzentrationen verschiedener Retinoidmetaboliten im Lebergewebe erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die nach Entnahme unverzüglich in flüssigem Stickstoff gefrorenen Lebergewebeproben wurden bis zum Tage der Verarbeitung in 50ml Falcon-Tubes (Greiner, Frickenhausen) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Aufbereitung der Proben für die HPLC-Analyse wurde exakt 1 Gramm Lebergewebe pro Versuchstier abgewogen und nach Zugabe von Hank's Balanced Salt Solution homogenisiert. Die Deproteinisierung der Gewebeproben erfolgte durch Zugabe von Methanol (v/v; Rothisolv®; Roth, Karlsruhe), welchem Retinylacetat (all trans-Retinol Acetate; Sigma Chemical Co, St.Louis/Mo, USA) in einer Konzentration von  $50\mu\text{g/ml}$  als interner Standard hinzugefügt wurde. Die Extraktion der fettlöslichen Vitamine gelang durch Zugabe von n-Hexan (1:2.5 v/v; Lichrosolv®; Merck, Darmstadt) und Zentrifugation bei  $18.000\text{g}$  über 2min. Hierdurch wurde eine Auftrennung von zellulärer Phase und organischer Phase erreicht. Der Überstand (organische Phase mit dem Extrakt fettlöslicher Vitamine) wurde in einem Zentrifugalverdampfer (Univapo 100H; Axon, Kaiserslautern) getrocknet und zur endgültigen Messung mit Methanol resuspendiert.

Der Gehalt an Retinol und Retinylestern wurde in jeweils 20µl der aufbereiteten Proben bestimmt. Zur Anwendung kam ein HPLC-Analysesystem (Merck, Darmstadt) mit Rheodyne®-Injektor (Cotati/CA, USA), einer L-6200 A Merck-Hitachi-Pumpe und einer LiChroCart-Analysesäule (LiChrospher 250x3mm, RP select B, Partikelgrösse 5µm; Merck, Darmstadt), welcher eine LiChrospher 100 RP-18 Wächter-Säule vorgeschaltet war. Die Analysen erfolgten unter Verwendung isochratischer Elution mit einer mobilen Phase aus Methanol und Wasser (95:1 v/v) und einer Flussrate von 0.8ml/min. Die Absorption von Vitamin A und seinen Metaboliten wurde bei 325nm mittels eines Merck-Hitachi-Detektors Typ L-4000 bestimmt. Um die Absorptionsmaxima den verschiedenen Vitamin A-Metaboliten zuordnen zu können, wurden die Retentionszeiten von kommerziellen Retinoiden (Retinol, Retinyloleat, Retinylpalmitat, Retinylstearat; Sigma Chemical Co, St.Louis/Mo, USA) bestimmt. Desweiteren wurden Stammlösungen dieser Retinoide in einer Konzentration von 10mg/ml in Ethanol (Lichrosolv®; Sigma Chemical Co, St.Louis/Mo, USA) vorbereitet und in Dunkelheit bei -20°C gelagert. Aus diesen konnten dann Arbeitslösungen verschiedener Konzentrationen (10-100µg/ml) durch Verdünnung mit Methanol angefertigt werden. Diese dienten als externer Standard zur Berechnung der Retinoidkonzentrationen in den Leberproben. Die Datenkalkulation erfolgte mit der Software der HPLC-Datenstation (D-7000; Merck, Darmstadt). Die Verwendung von Retinylacetat als interner Standard erlaubte die Korrektur von Metaboliten-Verlusten während des Prozesses. Die Angabe der Messwerte erfolgte unter Annahme der Leberdichte von 1g/ml in µg/g Lebergewebe.

Bei allen Schritten der Aufbereitung wie auch bei der Lagerung der Proben wurde auf eine zügige Arbeitsweise und eine konstant niedrige Raumtemperatur Wert gelegt, um der Licht- und Temperaturempfindlichkeit der Retinoide Rechnung zu tragen.

### 5.3.6. Erfassung des Galleflusses

Die Katheterisierung des Ductus choledochus mit einem spitz angeschrägten Polyethylenkatheter und das Sammeln der Galleflüssigkeit in eine 1ml-Spritze erlaubte eine kontinuierliche Kontrolle und Quantifizierung des Galleflusses als Parameter der hepatozellulären Exkretionsfunktion. Hierzu wurde das Gallensekret 20, 40 und 60min nach Beginn

---

der intravitalmikroskopischen Untersuchungen gewogen (analytical Plus®, d=0.1mg; Otlews, Giessen) und unter der Annahme eines spezifischen Gewichtes von 1g/ml Gallensekret in Mikrolitern pro Minute und Gramm Lebergewicht standardisiert (SUMIMOTO et al, 1988).

## 5.4. Experimentelles Protokoll

### 5.4.1. Altersabhängige Unterschiede der Physiologie und Anatomie der Rattenleber (Altersstudie)

Ziel in diesem Teil der Untersuchung war es, sowohl anatomische Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen als auch physiologische Altersunterschiede mit Hilfe von Vitalparametern, Laborparametern und Intravitalmikroskopie zu erfassen.

Die Versuche umfassten insgesamt 24 Versuchstiere unterschiedlicher Altersgruppen, und zwar je 6 Tiere in einem Alter von 1 Monat, 3, 12 und 24 Monaten. Die Zuordnung innerhalb der altersgestaffelten Versuchsgruppen erfolgte randomisiert.

Bei allen Tieren erfolgte die Anästhesie und chirurgische Präparation wie unter 5.2.2. beschrieben und jedes Versuchstier wurde, wie unter 5.2.3. dargestellt, für die Intravitalmikroskopie vorbereitet. Während des Versuches wurde der mittlere arterielle Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet und zusätzlich wurden intermittierend Herzfrequenz, arterielle Blutgase, systemischer Hämatokritwert und systemische Leukozytenzahl ermittelt (5.3.1. und 5.3.4.1.) Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden wie unter 5.3.3. beschrieben durchgeführt und auf Videoband aufgezeichnet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte off-line und computergestützt (5.3.3.). Folgende mikrozirkulatorische Parameter wurden erfasst: Lebergeometrie (azinäre Größe, sinusoidaler Durchmesser, venulo-venulärer Abstand, venuläre Fläche, venuläre Länge), sinusoidale Dichte und Perfusionsrate, sinusoidaler Blutfluss, Fläche der Vitamin A-assozierten Autofluoreszenz, Verteilung und Abbleich-Zeit der hepatischen Sternzellen, sinusoidales Leukozytenfließverhalten, venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, Kupfferzellaktivität und -verteilung (5.3.3.1. – 5.3.3.7.).

Am Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde den Versuchstieren durch Punktion der Aorta ca. 4ml Vollblut zur Analyse leberspezifischer Enzyme entnommen (5.3.4.2.). Ebenso erfolgte die Asservierung des Lebergewebes zur Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes (5.3.5.). Die während des Versuches kontinuierlich gesammelte Gallenflüssigkeit wurde, wie unter 5.3.6. beschrieben, weiterverarbeitet.

### 5.4.2. Altersabhängige Modulation der LPS-induzierten Immunantwort durch G-CSF (Sepsisstudie)

Die Versuche umfaßten insgesamt 54 Versuchstiere unterschiedlicher Altersgruppen, und zwar je 18 Tiere in einem Alter von 3, 12 und 24 Monaten. Die Tiere wurden je nach Alter folgenden Gruppen zugeordnet:

3 Monate: 6 Tiere ohne Vorbehandlung

6 Tiere mit Sepsisinduktion durch LPS

6 Tiere mit Vorbehandlung durch G-CSF und Sepsisinduktion durch LPS

12 Monate: 6 Tiere ohne Vorbehandlung

6 Tiere mit Sepsisinduktion durch LPS

6 Tiere mit Vorbehandlung durch G-CSF und Sepsisinduktion durch LPS

24 Monate: 6 Tiere ohne Vorbehandlung

6 Tiere mit Sepsisinduktion durch LPS

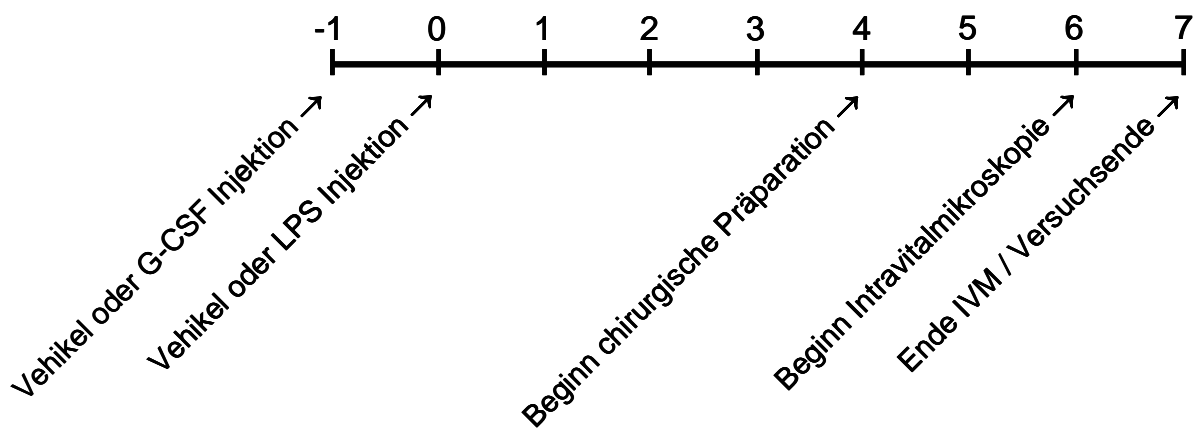
6 Tiere mit Vorbehandlung durch G-CSF und Sepsisinduktion durch LPS

Die Zuordnung innerhalb der altersgestaffelten Versuchsgruppen erfolgte randomisiert.

Bei allen Tieren erfolgte eine Vorbehandlung wie unter 5.2.1. beschrieben. Insbesondere erhielten alle Tiere, die kein G-CSF bzw. LPS erhielten, eine NaCl (0,9%) Injektion (Vehikel) zum entsprechenden Zeitpunkt, ebenfalls in Äthernarkose. Die Anästhesie und chirurgische Präparation erfolgte wie unter 5.2.2. beschrieben und jedes Versuchstier wurde, wie unter 5.2.3. dargestellt, für die Intravitalmikroskopie vorbereitet (Abb. 12). Während des Versuches wurde der mittlere arterielle Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet und zusätzlich wurden intermittierend Herzfrequenz, arterielle Blutgase, systemischer Hämatokritwert und systemische Leukozytenzahl ermittelt (5.3.1. und 5.3.4.1.) Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden wie unter 5.3.3. beschrieben durchgeführt und auf Videoband aufgezeichnet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte off-line und computergestützt (5.3.3.). Folgende mikrozirkulatorische Parameter wurden erfasst: Sinusoidale Dichte und Perfusionsrate, Verteilung und Abbleich-Zeit der hepatischen Sternzellen, sinusoidales Leukozytenfließverhalten, venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, Kupfferzell-aktivität und -verteilung. (5.3.3.1. – 5.3.3.7.).

Am Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 12) wurde den Versuchstieren durch Punktion der Aorta ca. 4ml Vollblut zur Analyse leberspezifischer Enzyme sowie systemischer Zytokine und Chemokine entnommen und aufbereitet (5.3.4.2. und 5.3.4.3.). Ebenso erfolgte die Asservierung des Lebergewebes zur Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes (5.3.5.). Die während des Versuchs kontinuierlich gesammelte Gallenflüssigkeit wurde, wie unter 5.3.6. beschrieben, weiterverarbeitet.



**Abbildung 12:** Zeitlicher Versuchsablauf in Stunden (h)



## 5.5. Statistik

### 5.5.1. Datenerfassung und statistische Auswertung

Die primäre Datenerfassung erfolgte während der Auswertung der Videobänder auf Erhebungsbögen. Die so gewonnenen Daten wurden in einem zweiten Schritt in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel; Microsoft Corporation, Unterschleißheim) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung kamen die Programme SigmaStat Version 2 und SigmaPlot Version 4 (Jandel Corporation, San Rafael/CA, USA) zur Anwendung.

Aus den pro Untersuchungsparameter ausgewerteten 10 Gesichtsfeldern eines jeden Versuchstieres wurde der Mittelwert (MW) berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchstiere wurden dann zur Berechnung eines Gruppenmittelwertes herangezogen. Auf die gleiche Weise errechnete sich der Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

Nach Prüfung auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianz erfolgte der Test auf statistische Signifikanz bei normalverteilten Daten mittels einer Varianzanalyse (ANOVA). Bei nicht parametrischer Verteilung wurde die "Kruskal-Wallis ANOVA on ranks" durchgeführt. Weiterhin erfolgte ein Einzelpaarvergleich mittels Student-Newman-Keuls-Test (bei normalverteilten Daten) oder Dunn's-Test (bei nicht normalverteilten Daten).

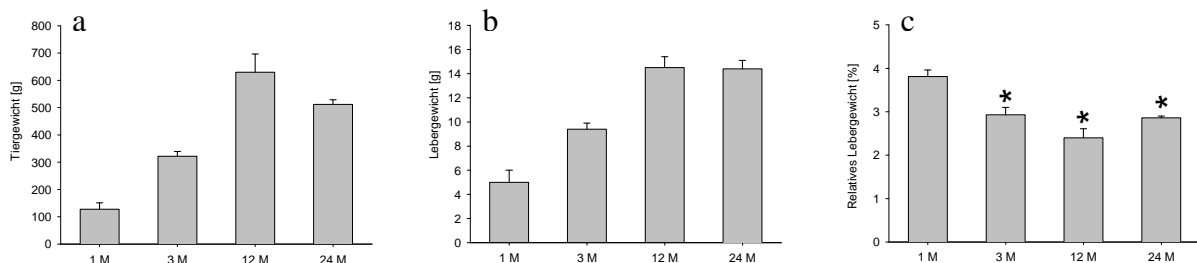
Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 6. Ergebnisse der Altersstudie

### 6.1. Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht

Das mittlere Körpergewicht betrug für die 1 Monat, 3, 12 und 24 Monate alten Versuchstiere  $128 \pm 23\text{g}$ ,  $322 \pm 17\text{g}$ ,  $630 \pm 67\text{g}$  und  $512 \pm 17\text{g}$  und zeigte damit einen Anstieg auf das 4- bis 5-fache vom 1 Monat alten Tier bis zum 24 Monate alten Tier (Abb. 12a). Das maximale Gewicht erreichten die hier untersuchten Altersgruppen mit 12 Monaten ( $630 \pm 67\text{g}$ ) mit einer leichten Gewichtsreduktion im Alter von 24 Monaten ( $512 \pm 17\text{g}$ ).

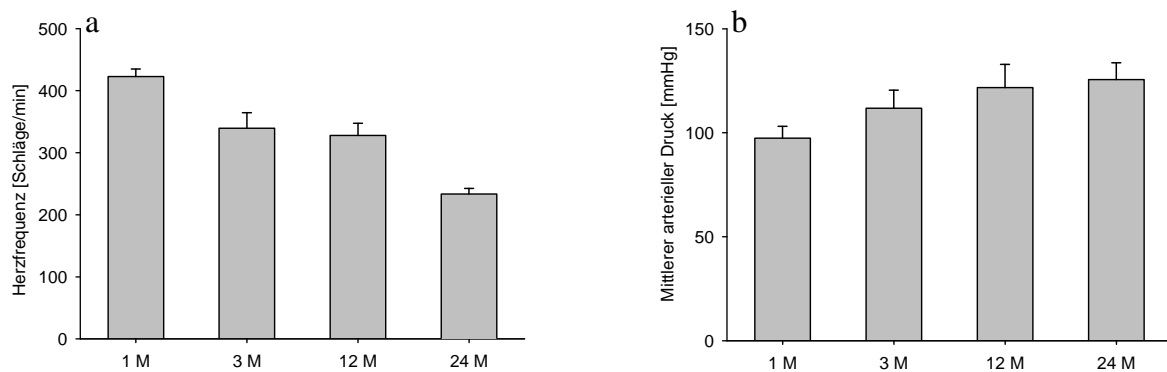
Das absolute Lebergewicht nahm von 5,0g bei 1 Monat alten Tieren auf 14,5g bei 24 Monate alten Tieren zu (Abb. 12b). Das relative Lebergewicht im Bezug zum Körpergewicht der Versuchstiere war bei 1 Monatstieren mit 3,8% signifikant höher als bei 3 bis 24 Monate alten Tieren mit 2,4% bis 2,9% (Abb. 12c).



**Abbildung 12a, b, c:** Tiergewicht, absolutes Lebergewicht und relatives Lebergewicht der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,01$  vs. 1M.

### 6.2. Makrohämodynamik

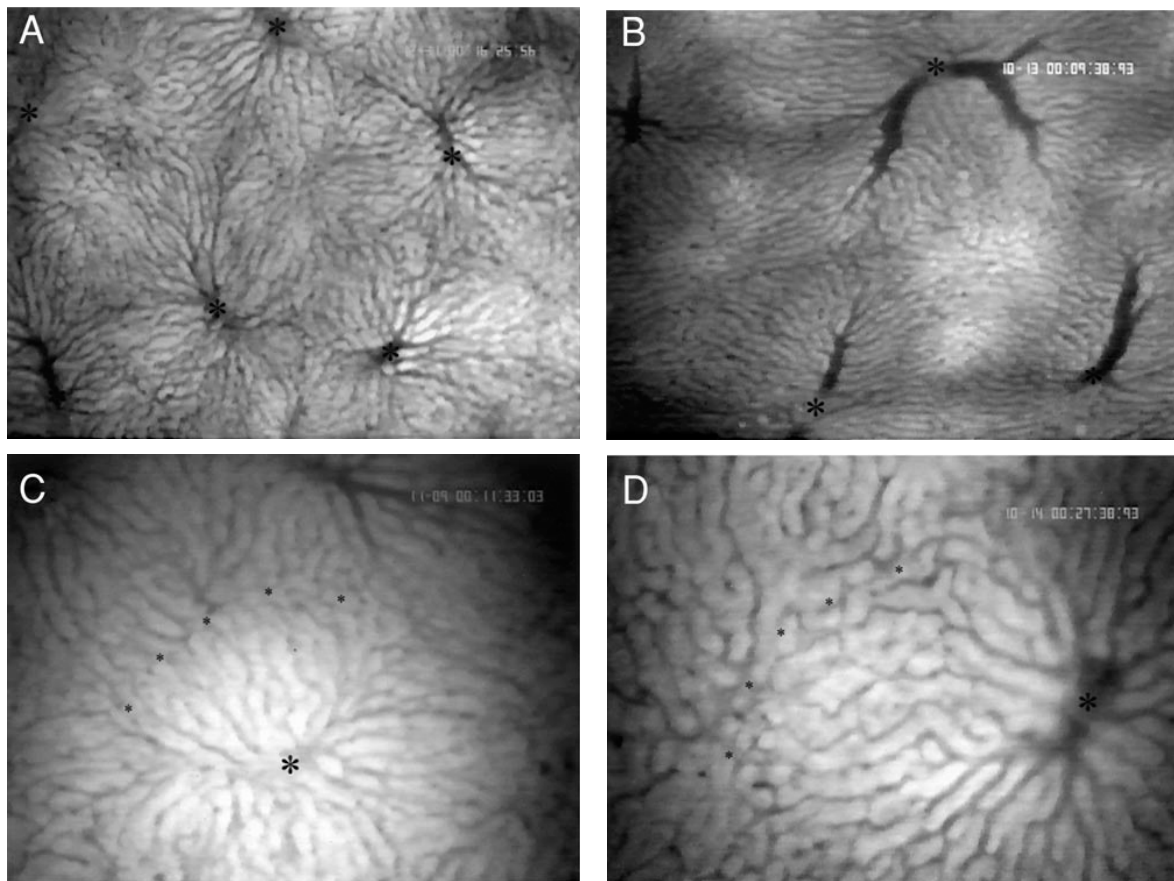
Vergleichbar zum menschlichen Organismus änderten sich auch die systemischen hämodynamischen Parameter in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere. Die Herzfrequenz war mit 423 Schlägen/min bei den 1 Monat jungen Tieren am höchsten und nahm bei 3, 12 und 24 Monate alten Tieren mit 340, 328 und 234 Schlägen/min ab (Abb. 13).



**Abbildung 13a, b:** Herzfrequenz und mittlerer arterieller Druck der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 6.3. Lebermorphologie und hepatische Mikrozirkulation

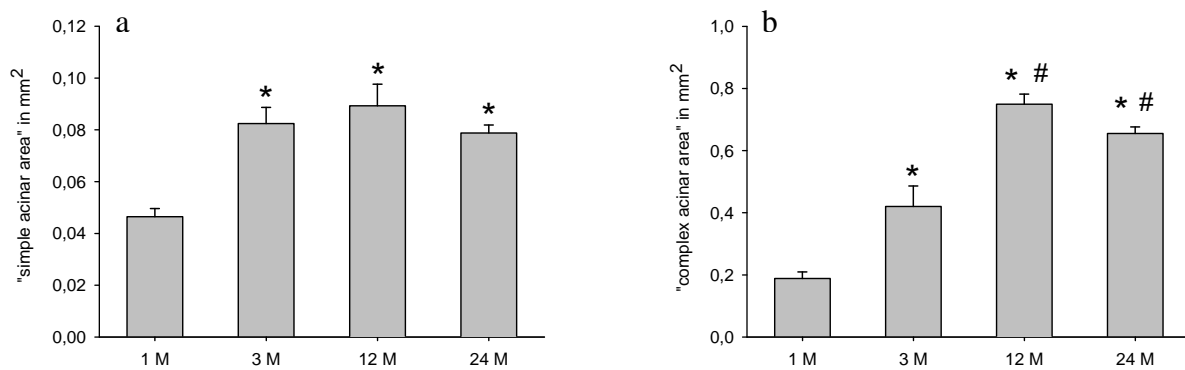
Die Morphologie der Leber zeigte zwischen den Altersgruppen keine Unterschiede. Die Struktur der Azini mit ihrem hexagonalen Netzwerk an Sinusoiden, die in eine postsinusoidale Zentralvene münden, konnte in allen untersuchten Altersstufen beobachtet werden. Ebenfalls konnte bei allen Tiergruppen die periportale Region mit ihrem sternförmigen Ursprung der periportal Sinusoide identifiziert werden. Zuführende Gefäße (terminale hepatische Arteriolen der A. hepatica propria oder terminale Venolen der V. porta) konnten in allen Tiergruppen nur selten aufgefunden werden, zur Leberoberfläche parallel laufende postsinusoidale Venolen wurden hingegen regelhaft gesehen. Die klassische lobuläre Architektur, bei der die postsinusoidale Venole von einer hexagonalen Parenchymstruktur umgeben ist, die an den Ecken von portalen Feldern begrenzt wird, konnte in allen Altersstufen regelhaft beobachtet werden (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Leber eines 1 Monate (A und C) und 24 Monate alten (B und D) Versuchstieres. Bildaufzeichnung mittels Epi-Illumination mit blauem Licht und einer Vergrößerung von 100fach (A und B) bzw. 200fach (C und D). Die in den Bildern eingezeichneten kleinen Sterne markieren jeweils die periportale Region, die eingezeichneten großen Sterne die perizentrale Region mit der Zentralvene.

### 6.3.1. Azinäre Größe

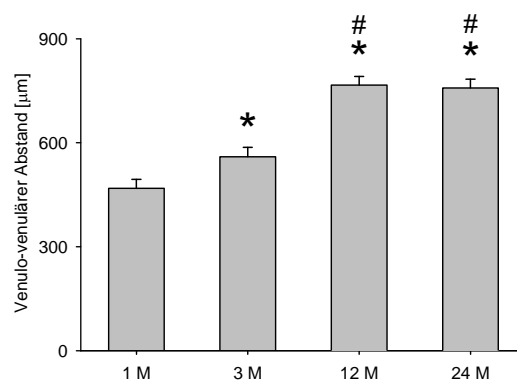
In der quantitativen planimetrischen Auswertung der lobulären Struktur der Leber zeigte sich eine Größenprogredienz der einfachen azinären Fläche (simple acinar area) von  $0,047 \text{ mm}^2$  bei Tieren im Alter von 1 Monat auf  $0,089 \text{ mm}^2$  bei Tieren im Alter von 12 Monaten bzw.  $0,079 \text{ mm}^2$  bei Tieren im Alter von 24 Monaten (Abb. 15a). Vergleichbar konnte auch bei dem Parameter der komplexen azinären Fläche (complex acinar area) eine Größenzunahme von  $0,19 \text{ mm}^2$  bei einem 1 Monatstier auf  $0,66 \text{ mm}^2$  bei einem 24 Monatstier festgestellt werden (Abb. 15b).



**Abbildung 15a, b:** „simple acinar area“ und „complex acinar area“ in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M, #  $p < 0,05$  vs 3M.

### 6.3.2. Venulo-venulärer Abstand

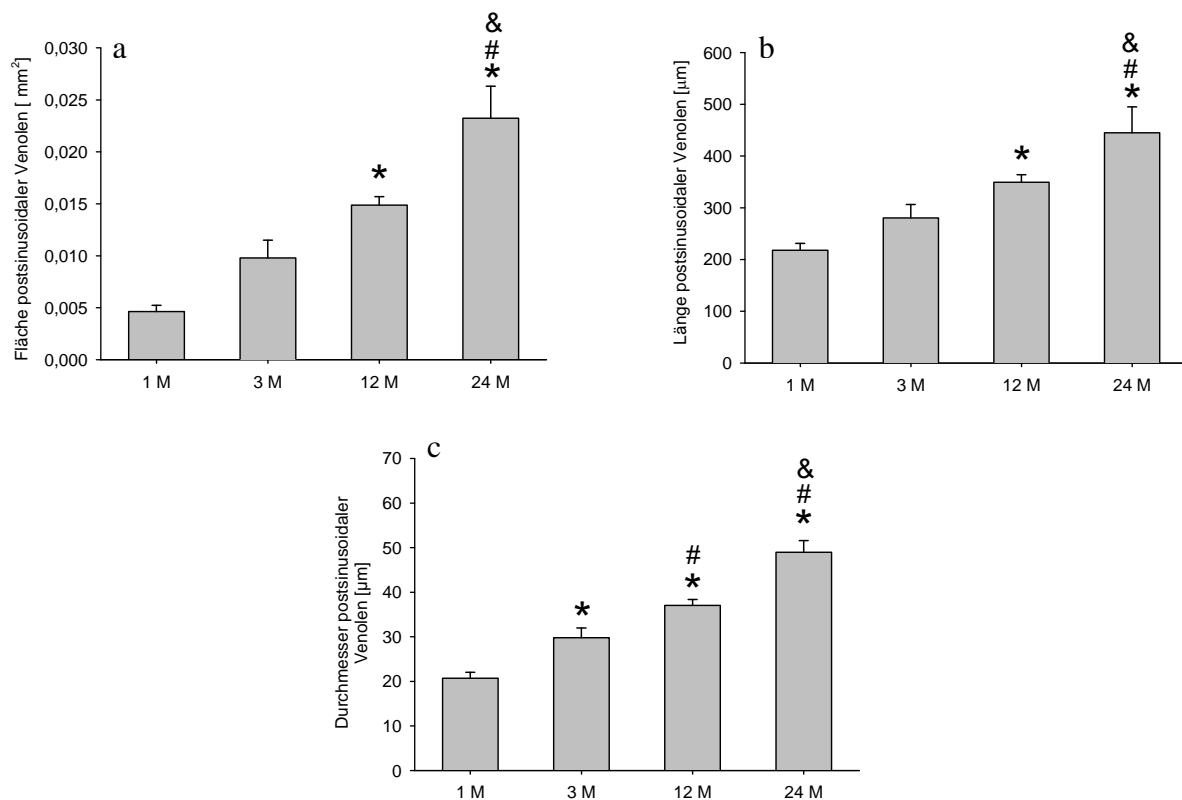
Der mittlere Abstand zwischen zwei bei der Auflichtmikroskopie erkennbaren benachbarten Venolen wurde mit zunehmendem Alter grösser und erreichte bei 12 Monate alten Tieren das Maximum (1M:  $469 \pm 26,2 \mu\text{m}$ ; 3M:  $560 \pm 27,2 \mu\text{m}$ ; 12M:  $766 \pm 25,2 \mu\text{m}$ ; 24M:  $758 \pm 25,7 \mu\text{m}$ ) (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Venulo-venulärer Abstand in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M, #  $p < 0,05$  vs 3M.

### 6.3.3. Geometrie der postsinusoidalen Venolen

Die bei der Auflichtmikroskopie sichtbare Fläche der zentralen Venolen wird altersabhängig kontinuierlich größer, von  $0,005\text{mm}^2$  bei 3 Monate alten Tieren bis zu  $0,023\text{mm}^2$  bei 24 Monate alten Tieren (Abb. 17a).

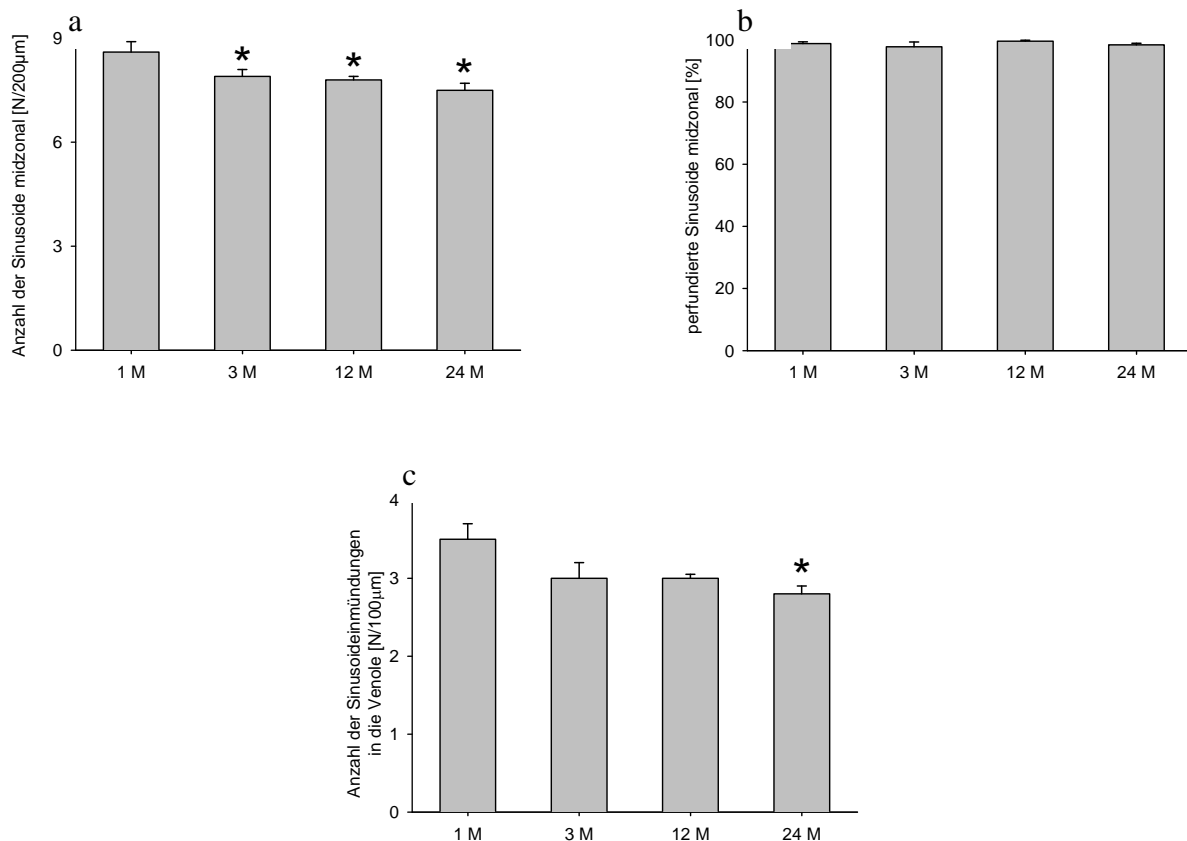


**Abbildung 17a, b, c:** Fläche (a), Länge (b) und Durchmesser (c) postsinusoidaler Venolen bei Auflichtmikroskopie der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  vs 1M, #  $p<0,05$  vs 3M, &  $p<0,05$  vs 12M.

Auch konnte mit zunehmendem Alter der Versuchstiere eine kontinuierliche signifikante Größenprogredienz sowohl der sichtbaren Länge (Abb. 17b) als auch des Durchmessers der postsinusoidalen Venole (Abb. 17c) beobachtet werden.

### 6.3.4. Sinusoidales Verteilungsmuster im Azinus

Die Verteilung der Sinusoide im Azinus wurde sowohl midzonal als auch im Bereich der Mündung in die postsinusoidale Venole erfasst. Die Anzahl der midzonal über einen Querschnitt von 200µm gezählten Sinusoide war in den Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate alten Tieren signifikant niedriger als bei 1 Monat alten Tieren, unterschied sich jedoch innerhalb der älteren Altersgruppen nicht (1M: 8,6/200µm; 3M: 7,9/200µm; 12M: 7,8/200µm; 24M: 7,5/200µm). Die Anzahl der von diesen midzonalen Sinusoiden auch perfundierten Sinusoiden unterschied sich nicht zwischen den Altersgruppen und betrug zwischen 98% und 100% (Abb. 18a und Abb. 18b).



**Abbildung 18a, b, c:** Anzahl der Sinusoide midzonal über einen Querschnitt von 200µm (a), relative Anzahl der perfundierten Sinusoide midzonal in der Leber (b) und Anzahl der Sinusoideinmündungen in die Zentralvenole über eine Länge von 100µm (c) der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M.

Die Anzahl der pro 100µm in eine Venole mündenden Sinusoide nahm von den jüngsten zu den ältesten Tieren stetig ab, wobei nur der Wert der 24 Monatstiere sich signifikant von den jüngsten Tieren unterschied (Abb. 18c).

### 6.3.5. Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Sinusoiden und sinusoidaler Blutfluss

Der sinusoidale Blutfluss unterschied sich mit Werten zwischen 6,8 und 9,2 pl/s kaum zwischen den Altersgruppen, jedoch war bei 1 Monat alten Tieren im Vergleich zu den älteren eine schnellere Erythrozytenfließgeschwindigkeit bei niedrigeren sinusoidalen Durchmessern für den vergleichbaren sinusoidalen Blutfluss entscheidend (Tab. 1).

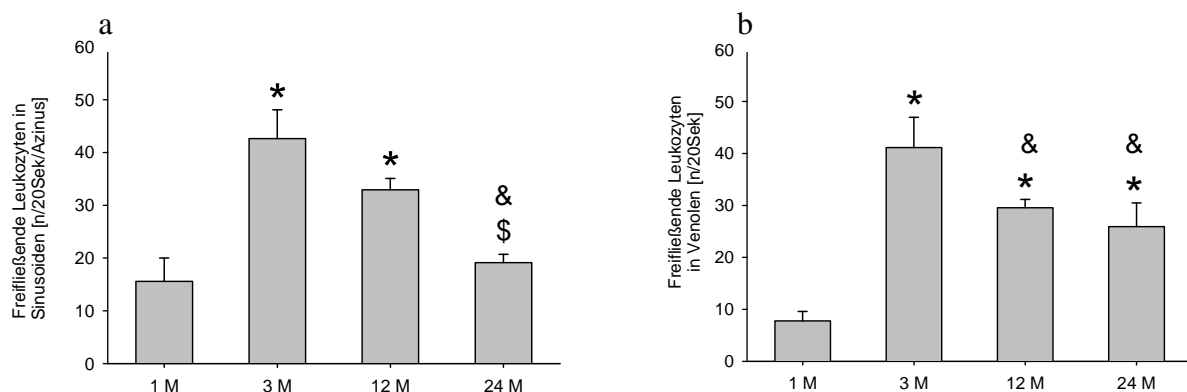
		1 Monat	3 Monate	12 Monate	24 Monate
Sinusoidaler Durchmesser	[µm]	5,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1
Sinusoidale Erythrozytenfließgeschwindigkeit	[µm/s]	315 ± 8,8	261 ± 23,0	222 ± 23,7	196 ± 21,9
Sinusoidaler Blutfluss	[pl/s]	7,7 ± 0,5	9,2 ± 0,7	7,7 ± 0,8	6,8 ± 0,7

**Tabelle 1:** Sinusoidaler Durchmesser in µm, sinusoidale Erythrozytenfließgeschwindigkeit in µm/s und sinusoidaler Blutfluss in pl/s in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM.



### 6.3.6. Sinusoidale und postsinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

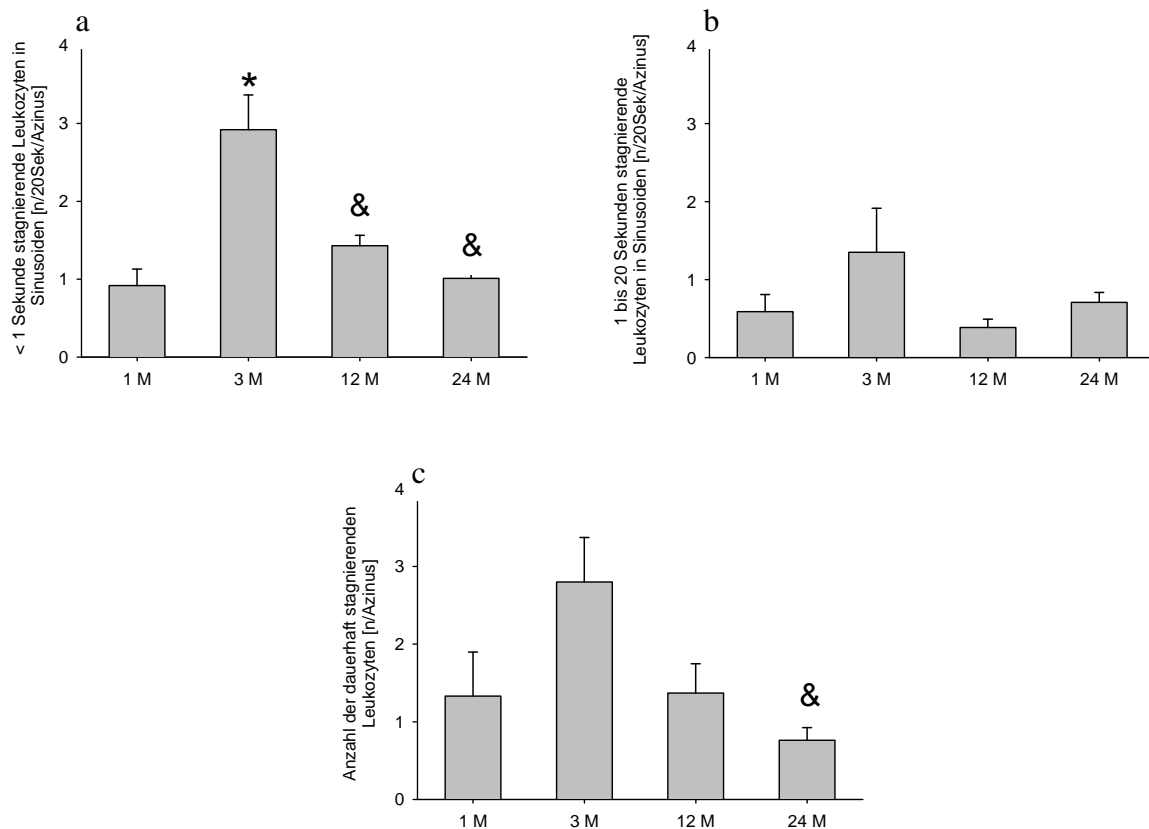
Die Anzahl der Leukozyten, die die Lebersinusoiden und postsinusoidalen Venolen durchfließen, erreichte bei den 3 und 12 Monate alten Tieren das Maximum. Der sinusoidale Leukozytenfluss war 2,5 bis 3 mal höher, als bei 1 Monatstieren (in 20 Sekunden 1M:  $16 \pm 4,4$ ; 3M:  $43 \pm 5,5$ ; 12M:  $33 \pm 2,2$ ) und der Leukozytenfluss in postsinusoidalen Venolen war 3,5 bis 5 mal höher als bei 1 Monatstieren (in 20 Sekunden: 1M:  $8 \pm 1,8$ ; 3M:  $41 \pm 5,8$ ; 12M:  $30 \pm 1,6$ ). Im Alter von 24 Monaten war diese Anzahl wieder niedriger und erreichte bei den die Sinusoide durchfließenden Leukozyten wieder Werte, die mit denen der 1 Monatstiere vergleichbar waren (in 20 Sekunden 1M:  $16 \pm 4,4$ ; 24 M:  $19 \pm 1,6$ ).



**Abbildung 19a, b:** Anzahl der im Gefäßsystem freifließenden Leukozyten über einen Zeitraum von 20 Sekunden in azinären Sinusoiden (a) bzw. in postsinusoidalen Venolen (b) in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M, &  $p < 0,05$  vs 3M, \$  $p < 0,05$  vs 12M.

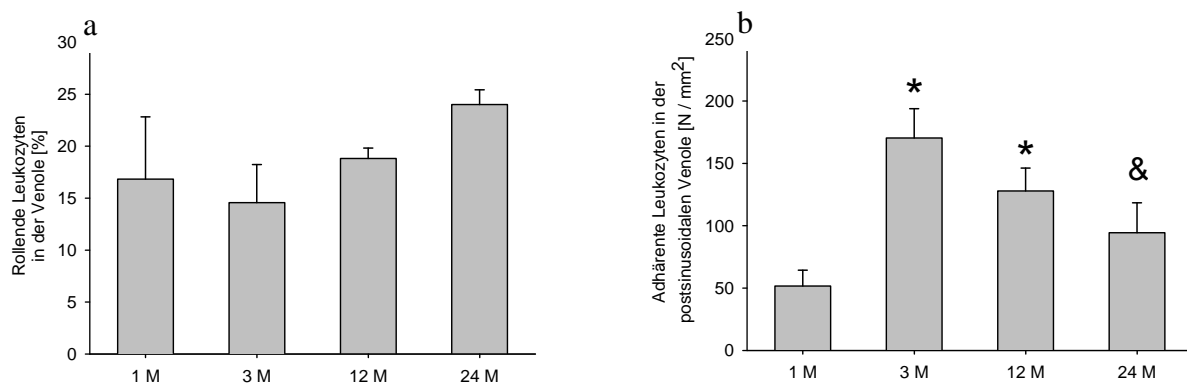
Die Anzahl der kürzer als eine Sekunde stagnierenden Leukozyten in den Sinusoiden war bei den 3 Monatstieren signifikant höher als in den übrigen Altersgruppen. Ein solcher Unterschied konnte bei der Anzahl der längerfristig aber nicht dauerhaft stagnierenden Leukozyten (1 bis 20 Sekunden) nicht beobachtet werden. Die Anzahl der stagnierenden Leukozyten pro Azinus war bei den Tieren im Alter von 3 Monaten höher, als bei den übrigen Altersgruppen, jedoch statistisch nur signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den 24 Monate alten Tieren. Weiterhin war die Anzahl der stagnierenden Leukozyten pro Azinus in

allen Tiergruppen kleiner als 20 / Azinus, so dass von physiologischen Verhältnissen ausgegangen werden kann (Abb. 20a-c).



**Abbildung 20a, b, c:** Anzahl der temporär stagnierenden Leukozyten im Azinus kürzer 1 Sekunde (a), zwischen 1 und 20 Sekunden (b) und der dauerhaft (länger als 20 Sekunden) stagnierenden Leukozyten (c) in den Sinusoiden der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M, &  $p < 0,05$  vs 3M.

Die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postsinusoidalen Venolen zeigte keinen Unterschied bei der relativen Anzahl der rollenden Leukozyten an den Endothelzellen der Venolenwand zwischen den Altersgruppen. Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Venolenwand zeigte einen Maximalwert bei 3 Monate alten Tieren im Vergleich zu den übrigen Altersgruppen (Abb. 21a,b).



**Abbildung 21a, b:** Anzahl der rollenden Leukozyten in % der gesamtfließenden (a) und Anzahl der adhärenenten Leukozyten (b) an der Wand postsinusoidaler Venolen in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  vs 1M, &  $p<0,05$  vs 3M.

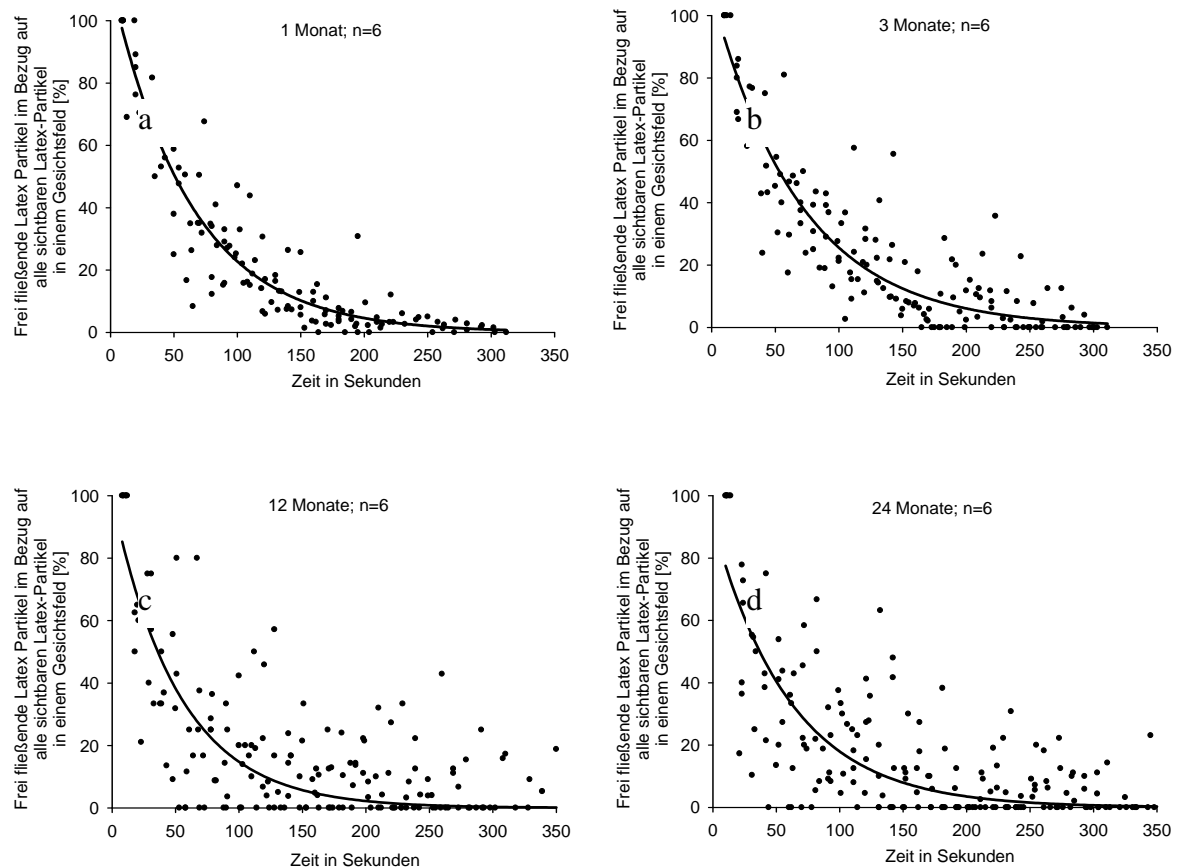
### 6.3.7. Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen und deren Verteilung im Azinus

Die Kupfferzell-Aktivität, erfasst mit Hilfe der Phagozytoserate von intraarteriell injizierten Latexpartikeln über die Zeit, zeigte in allen Altersgruppen eine vergleichbare Kinetik (Abb. 22a-d und Abb. 23), auch wenn tendenziell mit zunehmendem Alter eine Abnahme der negativen Kurvensteigung zu beobachten war (Abb. 22a-d).

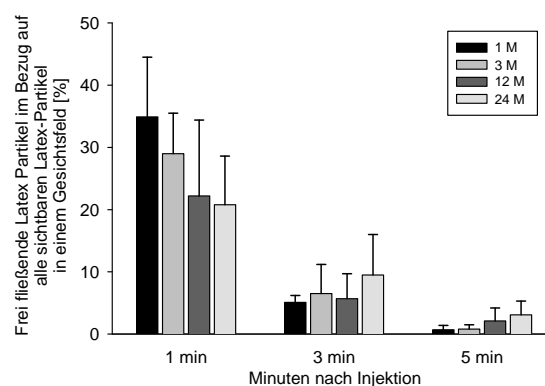
Die absolute Anzahl Phagozytose-aktiver Kupfferzellen war in allen Gruppen periportal größer als midzonal und midzonal wiederum größer als perizentral (Abb. 24a). Innerhalb der zonalen Verteilung war jeweils die absolute Anzahl der Phagozytose-aktiven Kupfferzellen pro mm<sup>2</sup> bei den 1 Monat alten Tieren höher als bei den 3 übrigen Altersgruppen, die eine weitgehend homogene Verteilung zeigten (Abb. 24a).

Die relative zonale Verteilung der Phagozytose-aktiven Kupfferzellen im Azinus bezogen auf alle im Azinus erfassten Phagozytose-aktiven Kupfferzellen zeigte innerhalb jeder Zone eine gleichförmige Verteilung zwischen den einzelnen Altersgruppen (Abb. 24b). Wie bei der absoluten Anzahl Phagozytose-aktiver Kupfferzellen (Abb. 24a) ist auch bei der

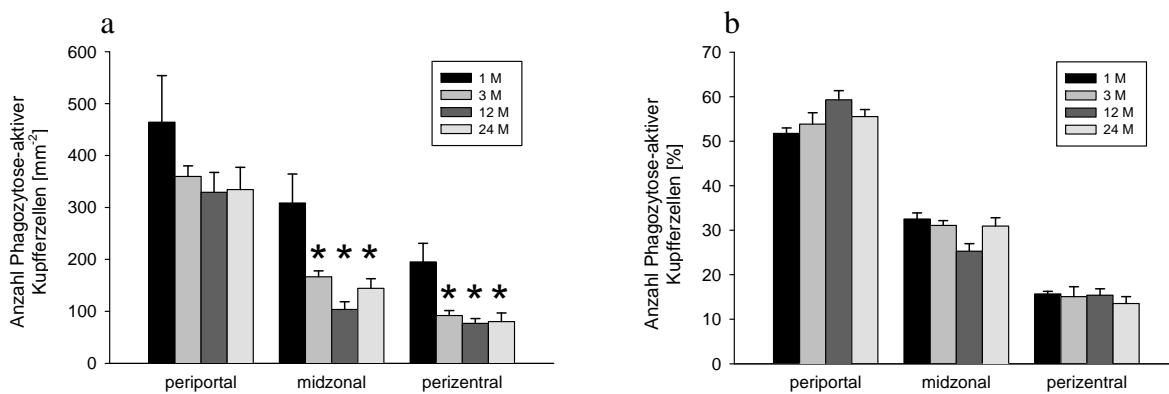
relativen Anzahl Phagozytose-aktiver Kupfferzellen eine kontinuierliche Abnahme in allen Altersgruppen von periportal über midzonal nach perizentral erkennbar (Abb. 24b).



**Abbildung 22a, b, c, d:** Relativer Anteil der frei fließenden Latex-Partikel zu allen im Gesichtsfeld sichtbaren Latex-Partikel aufgetragen über die Zeit in Sekunden. Angenähert wurde die jeweilige Punktwolke mit einer Kurve 3. Ordnung (Exponentieller Abfall).



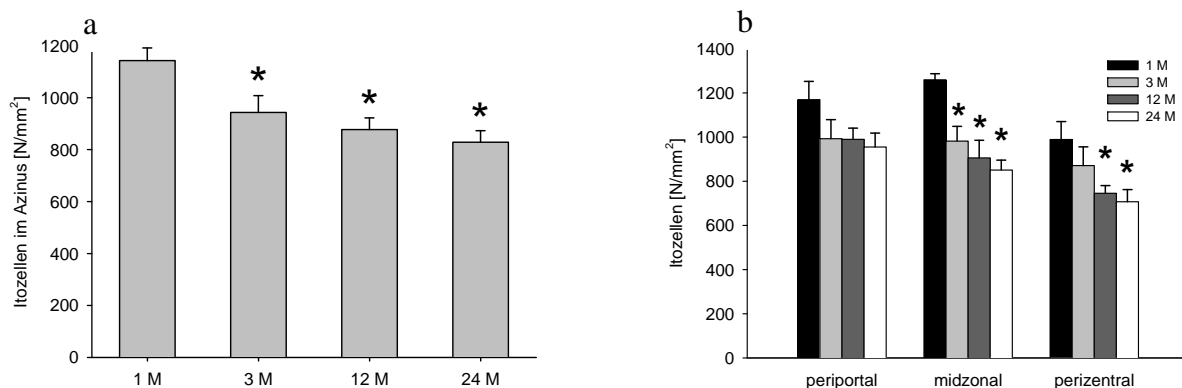
**Abbildung 23:** Relativer Anteil der frei fließenden Latex-Partikel zu allen im Gesichtsfeld sichtbaren Latex-Partikel zu den Zeitpunkten 1, 3 und 5 Minuten nach Injektion in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abbildung 24a, b:** Absolute Anzahl pro  $\text{mm}^2$  (a) und relative Anzahl in % (b) der durch Latex-Partikel markierten Kupferzellen in zonaler Verteilung des Azinus in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  vs 1M.

### 6.3.8. Hepatische Sternzellen

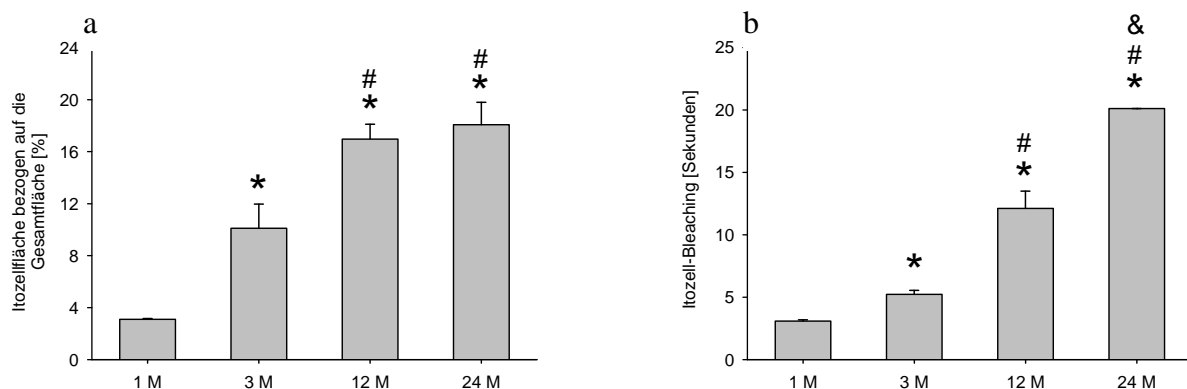
Die Anzahl der hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) pro Azinus nahm mit zunehmendem Alter ab (Abb. 25a). Diese Reduktion der Anzahl der hepatischen Sternzellen war in allen Bereichen des Azinus (periportal, midzonal und perizentral) gleichermaßen zu erkennen. Auch gab es eine deutliche zonale Verteilung der hepatischen Sternzellen, die in allen Altergruppen periportal und midzonal mehr hepatische Sternzellen pro  $\text{mm}^2$  aufwies als perizentral (Abb. 25b und Tab. 2).



**Abbildung 25a, b:** Anzahl der Ito-Zellen pro  $\text{mm}^2$  in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  vs 1M.

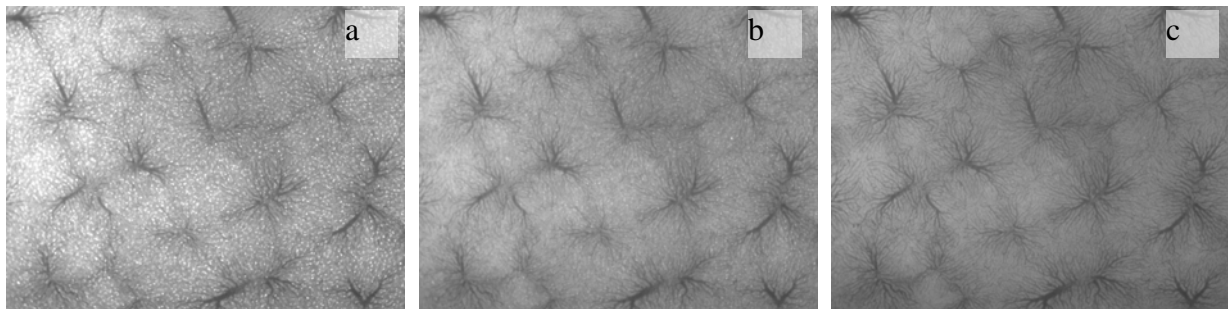
	1 Monat [N/mm <sup>2</sup> ]	3 Monate [N/mm <sup>2</sup> ]	12 Monate [N/mm <sup>2</sup> ]	24 Monate [N/mm <sup>2</sup> ]
	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
periportal	1169 ± 83,3	993 ± 85,8	990 ± 50,5*	955 ± 62,8*
midzonal	1260 ± 27,8*	982 ± 66,8	906 ± 79,7	851 ± 45
perizentral	989 ± 81,3	871 ± 84,7	746 ± 34,6	707 ± 54,9

**Tabelle 2:** Anzahl der hepatischen Sternzellen pro mm<sup>2</sup> in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM. \* p<0,05 vs perizentral.



**Abbildung 26a, b:** Relativer Anteil der planimetrisch bestimmten Fläche der Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen an der Gesamtfläche des gemessenen Gesichtsfeldes in Prozent (a) und Zeit des Ausbleichens der Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen in Sekunden (b) in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM. \* p<0,05 vs 1M, # p<0,05 vs 3M, & p<0,05 vs 12M.

Trotz Abnahme der absoluten Zahl der hepatischen Sternzellen pro Azinus in Abhängigkeit zum Alter, nahm der relative Anteil der planimetrisch bestimmten Fläche der durch die in den hepatischen Sternzellen gespeicherten Vitamin A Metabolite bedingten Autofluoreszenz pro Gesichtsfeld mit zunehmendem Alter zu (Abb. 26a). Weiterhin war auch die Dauer der Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen bis zum maximalen Ausbleichen mit zunehmendem Alter signifikant verlängert (Abb. 26b und Abb. 27a-c).



**Abbildung 27a, b, c:** Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Leber eines 3-monatigen Versuchstieres. Bildaufzeichnung bei Epi-Illumination mit grünem Licht und einer 5fachen Vergrößerung. Zu sehen ist die Autofluoreszenz der hepatischen Sternzellen mit maximaler Autofluoreszenz (a) zu Beginn der Mikroskopie dieses Gesichtsfeldes bis hin zum kompletten Ausbleichen der hepatischen Sternzellen (c).

## 6.4. Vollblut- und Serumanalytik

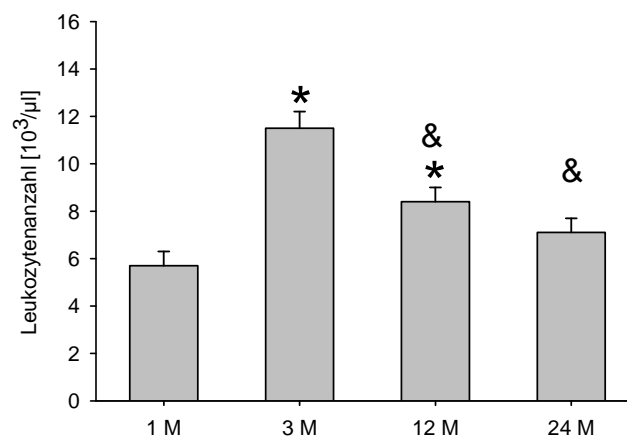
### 6.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl

Bei den in der Blutgasanalyse ermittelten Parametern pH, pCO<sub>2</sub>, sO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub> ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen (Tab. 3). Auch der systemische Hämatokrit war in den Gruppen statistisch nicht unterschiedlich, obwohl er altersabhängig tendenziell anstieg (Tab. 4).

	pO <sub>2</sub> [mmHg]	sO <sub>2</sub> [%]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
1 M	79 ± 5,0	93 ± 1,7	48 ± 2,7	7,29 ± 0,02
3 M	95 ± 2,7	97 ± 0,2	46 ± 1,8	7,35 ± 0,02
12 M	87 ± 5,4	95 ± 0,8	54 ± 9,3	7,34 ± 0,02
24 M	95 ± 4,3	97 ± 0,4	48 ± 2,1	7,37 ± 0,02

**Tabelle 3:** Parameter der arteriellen BGA der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM.

	Hkt [%]
1 M	44 ± 1,0
3 M	47 ± 1,9
12 M	48 ± 1,5
24 M	48 ± 1,1



**Tabelle 4:** Hämatokrit der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM.

**Abbildung 28:** Systemische Leukozytenzahl der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je n=6). Mittelwerte ± SEM. \* p < 0,05 vs 1M, & p < 0,05 vs 3M..

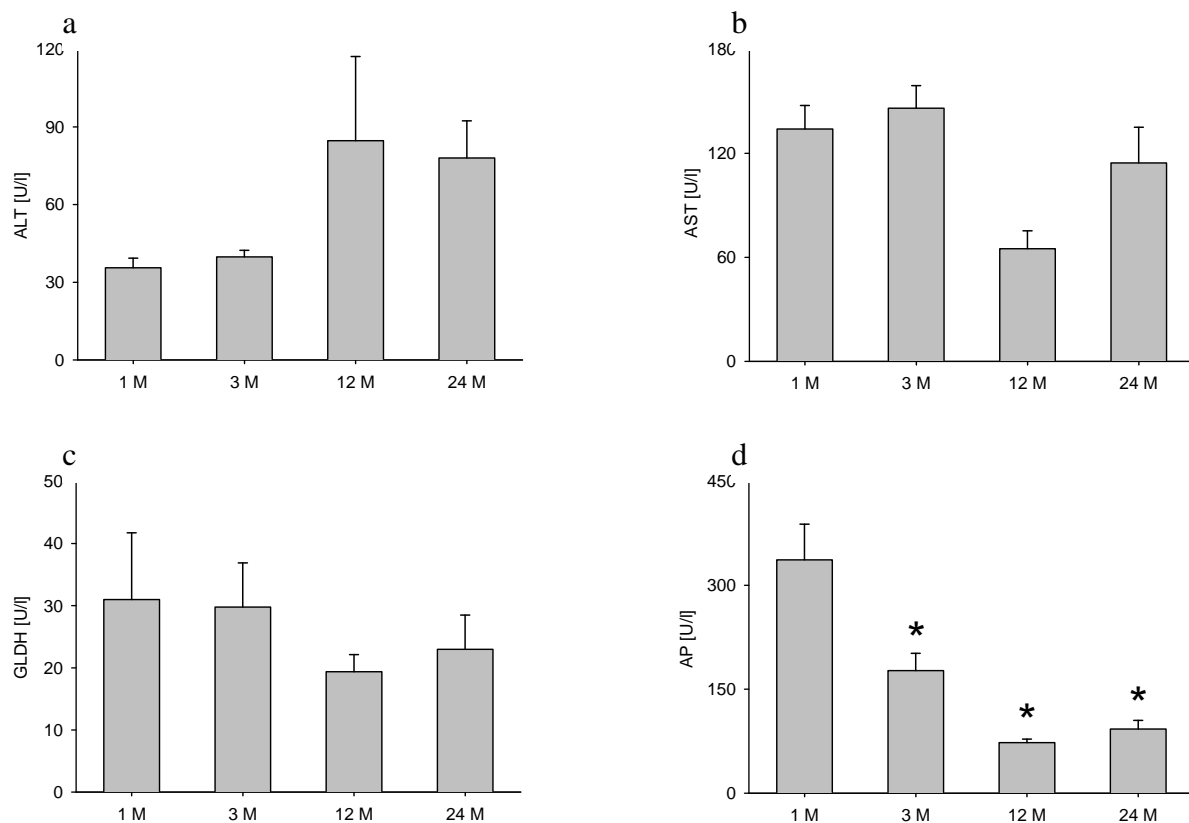


Die systemische Leukozytenzahl pro  $\mu\text{l}$  Vollblut war bei 3 Monate alten Tieren signifikant höher als bei den übrigen Altersgruppen und erreichte bei 24 Monate alten Tieren wieder Werte, die vergleichbar mit denen von 1 Monat alten Tieren waren (Abb. 28).

### 6.4.2. Aktivität der leberspezifischen Enzyme im Serum

Die Werte der Leberenzyme Aspartat-Amino-Transferase, Alanin-Amino-Transferase und Glutamatdehydrogenase unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Altersgruppen und befanden sich alle im Bereich physiologischer Werte als Zeichen der intakten hepatozellulären Integrität (Abb. 29a-c).

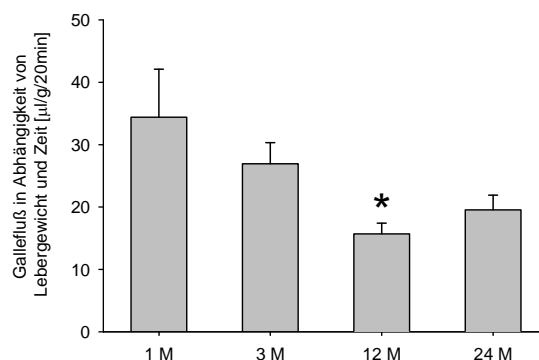
Die alkalische Phosphatase als ein Marker der Osteogenese war tendenziell bei den 3 Monate alten Tieren und signifikant bei den 1 Monat alten Tieren gegenüber den älteren Altersgruppen erhöht (Abb. 29d).



**Abbildung 29 a, b, c, d:** Serumenzymbestimmungen aus arteriellen Blutproben der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs 1M.

## 6.5. Gallefluss

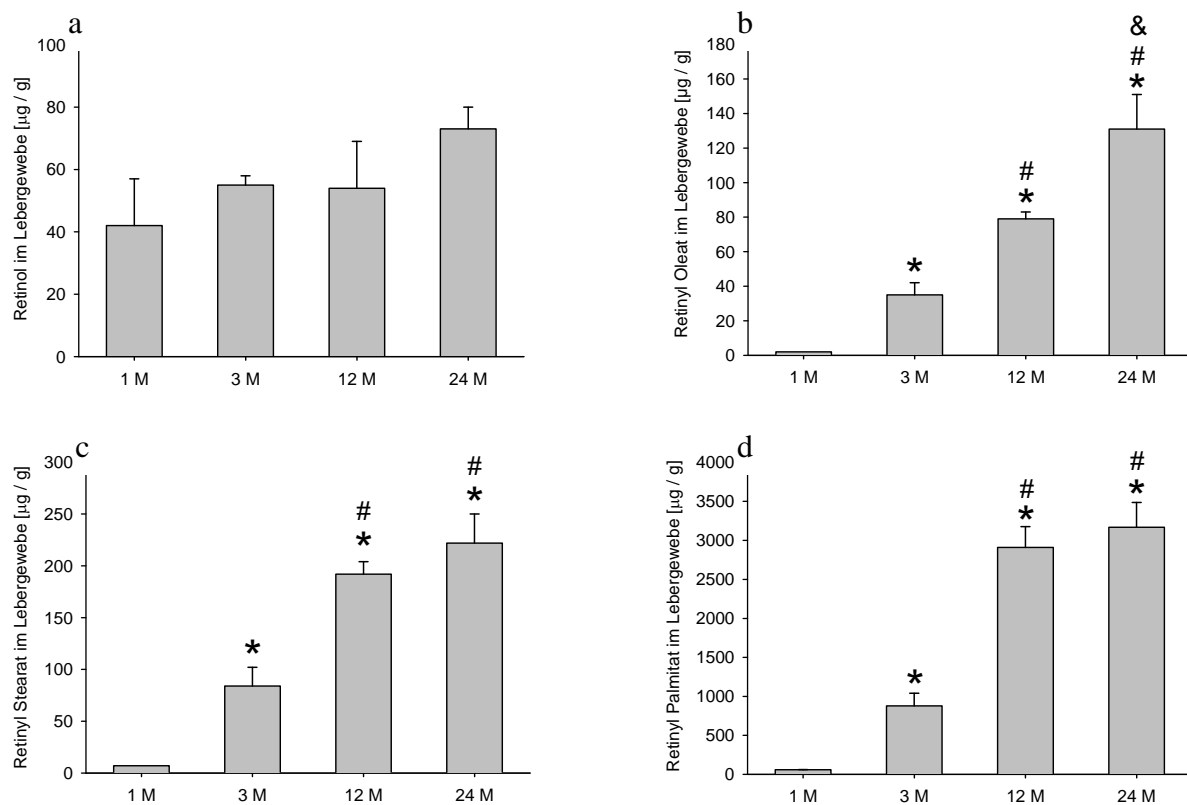
Der Gallefluss als ein Maß für die exkretorische Funktion des Lebergewebes nahm mit zunehmendem Alter ab und betrug bei 12 und 24 Monate alten Tieren nur noch ca. 50% des Wertes 1 Monat alter Tiere. Ein statistischer Unterschied lag nur zwischen den Gruppen der 1 Monat alten Tiere und der 12 Monate alten Tiere vor (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Gallefluss der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM.\*  $p<0,05$  vs 1M.

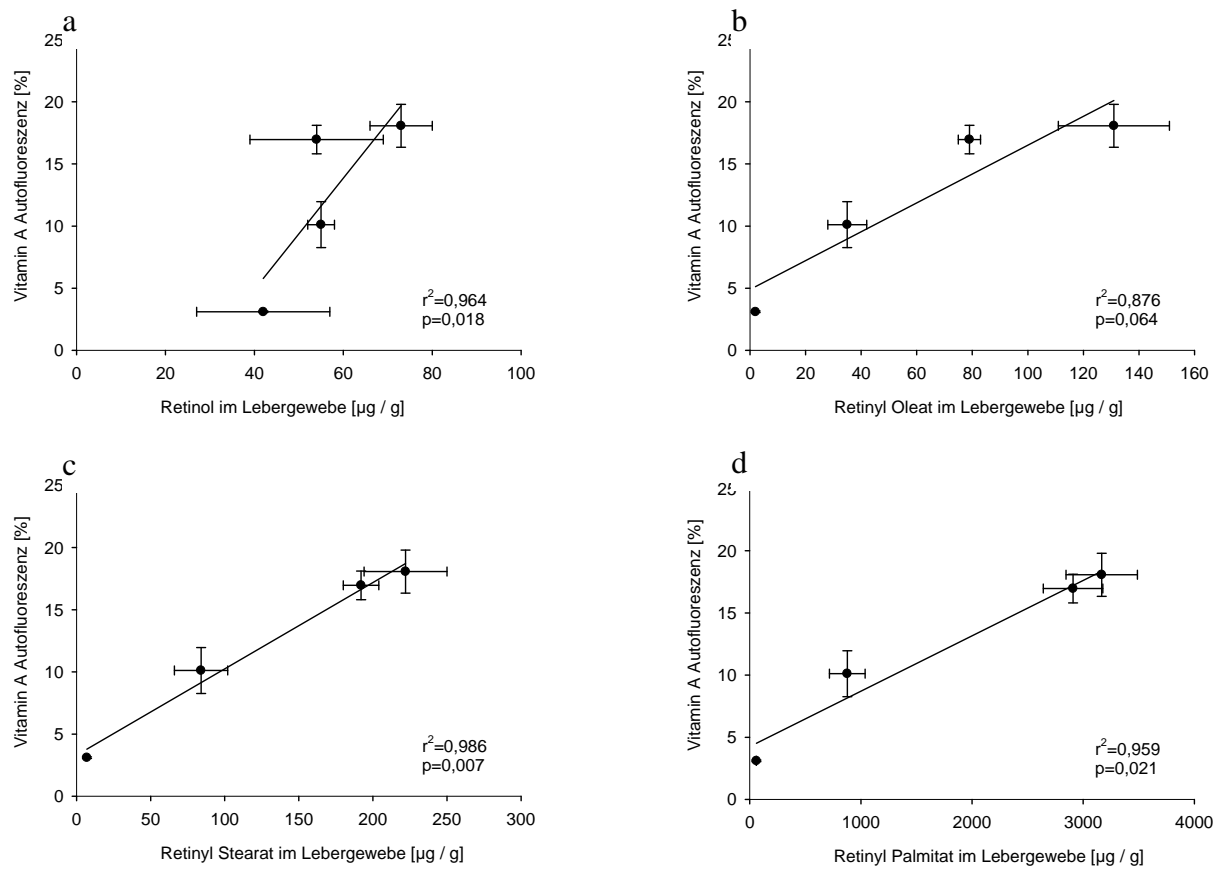
## 6.6. Vitamin A-Bestimmung im Leberparenchym

Der Gehalt an Vitamin A (Retinol) bzw. dessen Metaboliten (Retinyl Oleat, Retinyl Palmitat, Retinyl Stearat) nahm mit zunehmendem Alter kontinuierlich zu und zwar Retinol um das ca 2-fache, Retinyl Stearat um das ca. 32-fache, Retinyl Palmitat um das ca. 53-fache und Retinyl Oleat um das ca. 66-fache (Abb. 31a-d). Weiterhin war erkennbar, dass Vitamin A in der Rattenleber bei jungen Tieren (1 Monat) in der Mehrheit als Retinol und Retinyl Palmitat vorliegt. Dieses Verhältnis ändert sich innerhalb der Lebensspanne der Ratte, so dass bei den 24 Monate alten Tieren Vitamin A hauptsächlich als Retinyl Stearat und Retinyl Palmitat vorliegt (Abb. 31a-d).



**Abbildung 31a, b, c, d:** Der Gehalt an Retinol (a) bzw dessen Metaboliten Retinyl Oleat (b), Retinyl Stearat (c) und Retinyl Palmitat (d) in der Leber der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  vs 1M, #  $p<0,05$  vs 3M, &  $p<0,05$  vs 12M.

Zwischen den gemessenen Vitamin A Konzentrationen im Lebergewebe und den intravitalmikroskopisch bestimmten Flächen der Vitamin A Autofluoreszenz (Abschnitt 6.3.8) konnte eine signifikante lineare Korrelation gefunden werden (Abb. 32a-d).



**Abbildung 32a, b, c, d:** Regressionsanalyse der Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{g}$ ] an Retinol (a) bzw. dessen Metaboliten Retinyl Oleat (b), Retinyl Stearat (c) und Retinyl Palmitat (d) im Lebergewebe im Verhältnis zu der intravitalmikroskopisch gemessenen Fläche der Vitamin A Autofluoreszenz (relativ zur beobachteten Gesamtfläche) [%] der Tiere mit 1 Monat (M), 3, 12 und 24 Monaten (je  $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 6.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 6.7.1. Makrohämodynamik, Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht, Gallefluss, Vollblut- und Serumanalytik

Übertragen auf den menschlichen Alterungsprozess markieren die ausgewählten Altersstufen unserer Versuchstiere Eckpunkte in deren Lebensspanne. Dabei gelten die 1 Monat alten Tiere als „Kinder“, die 3 Monate alten Tiere als „Jugendliche“, die 12 Monate alten Tiere als „Erwachsene“ und die 24 Monate alten Tiere als „Greise“. Im Rahmen dieses Reifungs- und Alterungsprozesses konnten wir in der Makrohämodynamik eine mit dem Alter abnehmende Herzfrequenz und einen zunehmenden mittleren arteriellen Druck beobachten.

Bis zum 12. Lebensmonat kam es zu einer Gewichtszunahme der Tiere, die bis zum 24. Lebensmonat stagnierte. Auch das absolute Lebergewicht stieg mit zunehmendem Alter an, jedoch war das relative Lebergewicht im Bezug auf das Gesamtkörpergewicht bei den 1 Monat alten Tieren am höchsten und nahm auf einen niedrigeren Wert für die übrigen Altersgruppen ab.

Auch der Gallefluss pro Zeit im Verhältnis zum Lebergewicht nahm mit zunehmendem Alter ab.

In der arteriellen Blutgasanalyse der Tiere unterschiedlicher Altersgruppen zeigte sich sowohl bei den Blutgasen ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ) als auch bei  $sO_2$  und pH kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Ein moderater, aber statistisch nicht signifikanter Anstieg des Hämatokrits konnte ab einem Alter von 1 Monat bis zu 24 Monate beobachtet werden.

Die Konzentration an Leukozyten im peripheren Blut erreichte ihr Maximum bei den 3 Monate alten Tieren und nahm mit zunehmendem Alter wieder ab.

Es existierte kein Unterschied für die Aktivität an leberspezifischen Enzymen als Zeichen einer hepatozellulären Schädigung zwischen den Altersgruppen. Als Zeichen eines noch im Wachstum befindlichen Tieres wurde jedoch bei den 1 Monat alten Tieren eine erhöhte Konzentration an alkalischer Phosphatase, einem Indikator der Osteogenese, festgestellt.

### 6.7.2. Lebermorphologie und Vitamin A-Konzentration im Lebergewebe

Die azinäre Größe nahm im Alter von 1 bis zu 12 Monaten signifikant zu, veränderte sich jedoch bis zum Alter von 24 Monaten nicht mehr. Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch die Distanzmessung der postsinusoidalen Venolen. Auch hier kam es zu einer Zunahme bis zum 12. Lebensmonat, danach stagnierte jedoch der Wert.

Die altersabhängige Entwicklung der postsinusoidalen Venolen war von einer deutlichen Größenzunahme der intravitalmikroskopisch erfassbaren Fläche gekennzeichnet, die sowohl auf eine Zunahme der gemessenen Venolenlänge als auch auf einer Zunahme des Venolendurchmessers beruhte.

Das sinusoidale Verteilungsmuster im Azinus war von einer moderaten Abnahme der Sinusoidanzahl pro Längeneinheit gekennzeichnet, sowohl über den 200µm midzonalen Querschnitt im Azinus als auch über den 100µm perizentral gelegenen Einmündungsquerschnitt in die postsinusoidale Venole. Ein Perfusionsausfall konnte bei keiner der Tiergruppen beobachtet werden.

Der sinusoidale Blutfluss änderte sich zwischen den Altersgruppen nicht signifikant, jedoch beruhte dieser auf sinusoidalem Durchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit errechnete Wert auf unterschiedlichen Basiswerten: Bei den 1 Monat alten Tieren war der Durchmesser der Sinusoide kleiner die Erythrozytenfließgeschwindigkeit jedoch höher als bei den übrigen 3 Altersgruppen.

Die Anzahl der hepatischen Sternzellen nahm mit zunehmendem Alter ab. Weiterhin war eine in allen Altersgruppen gleichbleibende zonale Aufteilung der hepatischen Sternzellen im Azinus zu beobachten mit einer von periportal nach perizentral stetig abnehmendem Anzahl. Die durch die Vitamin A-Speicherung in den hepatischen Sternzellen entstehende Autofluoreszenz nahm jedoch signifikant zu, ersichtlich zum einen durch die altersabhängig längere Zeit bis zum Ausbleichen der Autofluoreszenz unter Belichtung als auch durch die Größenzunahme der planimetrisch bestimmten Fläche der Autofluoreszenz. Weiterhin waren auch die Konzentrationen von Vitamin A (Retinol) und dessen Metabolite (Retinyl Oleat, Retinyl Palmitat, Retinyl Stearat) signifikant altersabhängig gesteigert. Es konnte außerdem eine lineare Korrelation dieser Parameter in Bezug zur intravitalmikroskopisch bestimmten Fläche der Autofluoreszenz festgestellt werden.

### 6.7.3. Sinusoidale und postsinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Sowohl der sinusoidale als auch der venuläre Leukozytenfluss war bei den 3-Monatstieren 2- bis 3-fach höher, als bei den 1-Monatstieren, nahm jedoch im Alter von 12 und 24 Monaten wieder ab. Diese Daten sind evtl. durch die gleichförmig veränderten systemischen Leukozytenzahl dieser Altersgruppen erklärbar (siehe 6.7.1). Auch die Anzahl an in Sinusoiden stagnierenden Leukozyten war bei den 3-Monatstieren erhöht, vergleichbar mit der absoluten Leukozytenzahl im Blut und mit dem sinusoidalen Leukozytenfluss. Für die Anzahl der rollenden Leukozyten in Venolen bestand kein Unterschied zwischen den Altersgruppen. Bei der Anzahl der an der Venolenwand adhärenen Leukozyten ergab sich wiederum ein Maximum bei den 3 Monatstieren. Sowohl die Zahlen für in den Sinusoiden stagnierenden als auch für die in den Venolen rollenden oder adhärenen Leukozyten befanden sich im Bereich physiologischer Homöostase.

### 6.7.4. Kupferzellverteilung und -phagozytoseaktivität

Die Zahl an Phagozytose-aktiven Kupferzellen in der Leber war bei den 1 Monat alten Tieren in allen Zonen des Azinus signifikant höher als bei den 3, 12 und 24 Monate alten Tieren. Die relative zonale Verteilung der Phagozytose-aktiven Kupferzellen zeigte in allen Altersklassen im Azinus ein Verteilungsverhältnis von 5:3:2 für periportal zu midzonal zu perizentral.

Die Kinetik der Latexpartikel-Phagozytose als Parameter für die Aktivität der Kupferzellen war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Bei der Darstellung der Einzeldaten als Punktwolke zeigte sich lediglich, dass die Streubreite der Einzelwerte um eine Bestkurve mit zunehmendem Alter leicht zunahm.

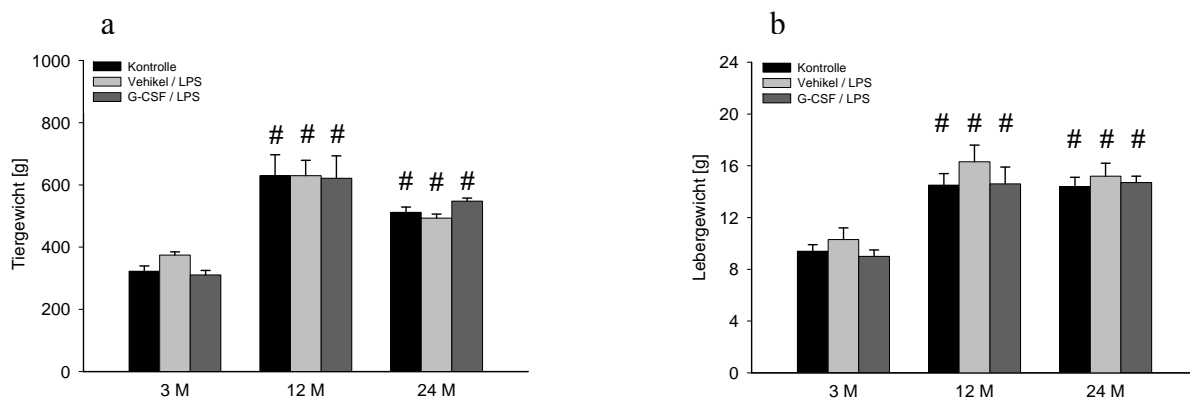
## 7. Ergebnisse der Sepsisstudie

### 7.1 Gewicht der Versuchstiere und Lebergewicht

Das mittlere Gewicht der Versuchstiere erreichte ein Maximum nach 12 Monaten und nahm bis zu einem Alter von 24 Monaten wieder moderat ab (Abb. 33a).

Das absolute Lebergewicht stieg von den 3 Monate alten Tieren zu den 12 Monate alten Tieren signifikant an und änderte sich mit weiter zunehmendem Alter nicht mehr (Abb. 33b).

Innerhalb der Vorbehandlungsgruppen gleichen Alters gab es bei Tier- und Lebergewicht keine Unterschiede.

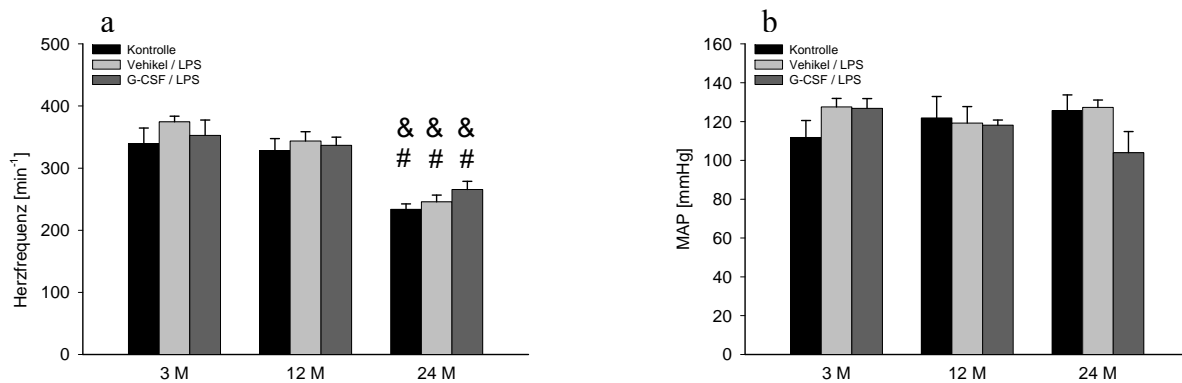


**Abbildung 33a, b:** Gewicht der Versuchstiere (a) und absolutes Lebergewicht (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten mit jeweils den Gruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. 3M.

### 7.2 Makrohämodynamik

Mit zunehmendem Alter der Versuchstiere kam es unabhängig von der Vorbehandlung zu einer Abnahme der Herzfrequenz mit signifikanten Unterschieden bei den 24 Monate alten Tieren (Abb. 34a).





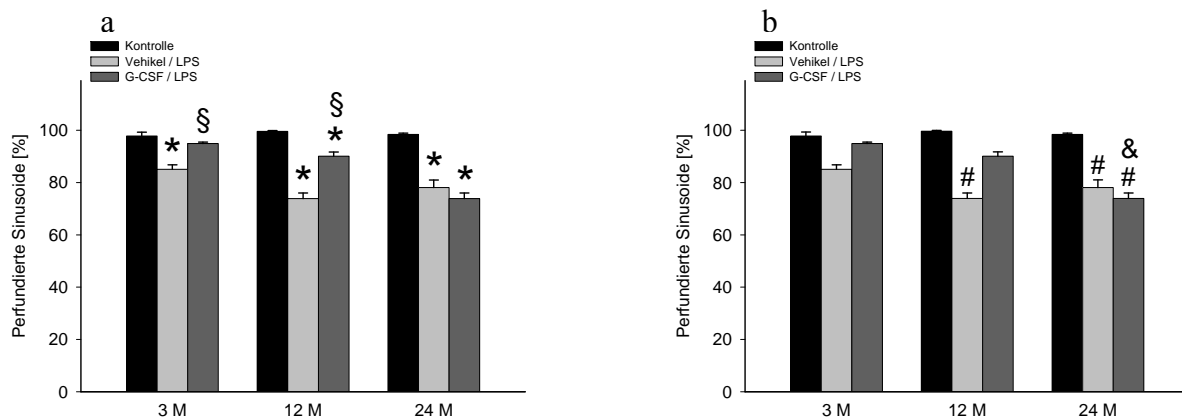
**Abbildung 34a, b:** Herzfrequenz (a) und mittlerer arterieller Druck (MAP) (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten mit jeweils den Gruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>  $p<0,05$  vs. 3M, <sup>&</sup>  $p<0,05$  vs. 12M.

Der mittlere arterielle Druck (MAP) unterschied sich nicht zwischen Tieren unterschiedlichen Alters oder unterschiedlicher Vorbehandlung (Abb. 34b).

## 7.3 Mikrozirkulation

### 7.3.1. Sinusoidale Perfusionsrate

Die relative Anzahl der perfundierten Sinusoide unterschied sich nicht zwischen den Kontrollen unterschiedlichen Alters (3M:  $98 \pm 1,5\%$ ; 12M:  $100 \pm 0,3\%$ ; 24M:  $98 \pm 0,5\%$ ). Im Vergleich innerhalb der Altersgruppen nahm die relative Anzahl der perfundierten Sinusoide in der Gruppe Vehikel/LPS jeweils signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab. Bei den 3 und 12 Monate alten Tieren war der Wert in den G-CSF/LPS Gruppen wieder signifikant höher als bei den Vehikel/LPS Gruppen, blieb jedoch bei den 12 Monate alten Tieren deutlich unter dem Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 35a).



**Abbildung 35a, b:** Relative Anzahl der perfundierten Sinusoide im Azinus mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und innerhalb einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

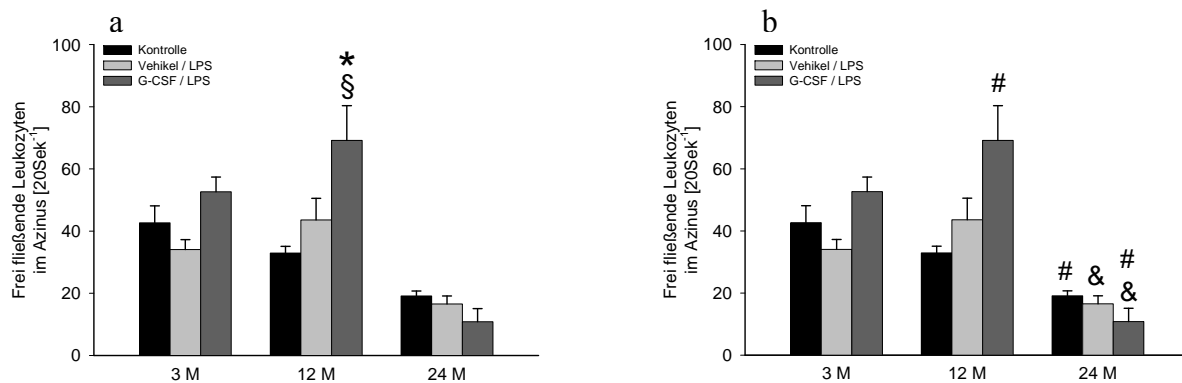
Der direkte Vergleich der Behandlungsgruppen zeigte, dass der Perfusionsausfall nach alleiniger LPS-Applikation in den Altersgruppen der 12 und 24 Monate alten Tiere signifikant stärker ausgeprägt war als bei den 3-Monatstieren. In der Gruppe 24M G-CSF/LPS waren signifikant weniger Sinusoide perfundiert als bei den vergleichbaren Behandlungsgruppen der 3 und 12 Monate alten Tieren (Abb. 35b).

## 7.3.2. Sinusoidale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

### 7.3.2.1. Frei fließende Leukozyten

Die Anzahl der frei fließenden Leukozyten nahm in den Kontrollgruppen mit zunehmendem Alter ab. In den Gruppen mit alleiniger Sepsisinduktion durch LPS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen des jeweiligen Alters. Eine Vorbehandlung mit G-CSF vor Sepsisinduktion bewirkte sowohl bei 3 als auch bei 12 Monate alten Tieren einen Anstieg der Anzahl an frei fließenden Leukozyten gegenüber alleiniger Sepsisinduktion in den gleichen Altersgruppen. Bei den 24 Monate alten Tieren

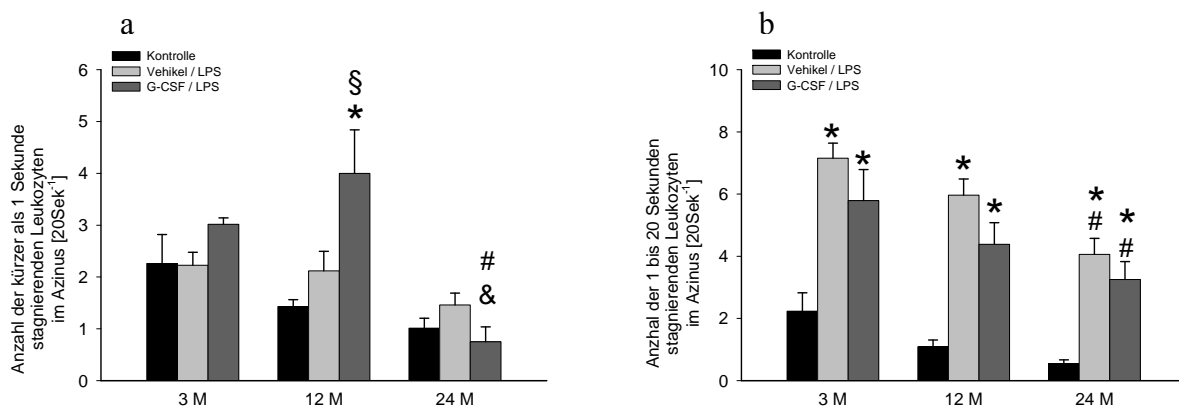
veränderte sich hingegen die Anzahl an frei fließenden Leukozyten unabhängig von der Behandlungsgruppe nicht (Abb. 36a,b).



**Abbildung 36a, b:** Anzahl an frei fließenden Leukozyten im Azinus mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und innerhalb einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS (n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p < 0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p < 0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p < 0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

### 7.3.2.2. Temporär stagnierende Leukozyten

Die Anzahl der temporär stagnierenden Leukozyten im Azinus, sowohl kurzfristig ( $\leq 1$  Sekunde) als auch längerfristig ( $> 1$  Sekunde und  $\leq 20$  Sekunden), nahm bei den Kontrollgruppen altersabhängig ab. Eine LPS-Stimulation bewirkte bei keiner Altersgruppe einen signifikanten Anstieg der kurzfristig adhärenen Leukozyten. G-CSF Vorbehandlung bewirkte bei den 3 und 12 Monate alten Tieren eine moderate bzw. signifikante Zunahme der kurzfristig adhärenen Leukozytenzahlen. Bei den 24 Monate alten Tieren kam es jedoch zu einer Reduktion unter das Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 37a).



**Abbildung 37a, b:** Anzahl an kurzfristig ( $\leq 1$  Sekunde) stagnierenden Leukozyten (a) oder längerfristig ( $> 1$  Sekunde und  $\leq 20$  Sekunden) stagnierenden Leukozyten (b) im Azinus der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, <sup>§</sup>  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, <sup>#</sup>  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, <sup>&</sup>  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

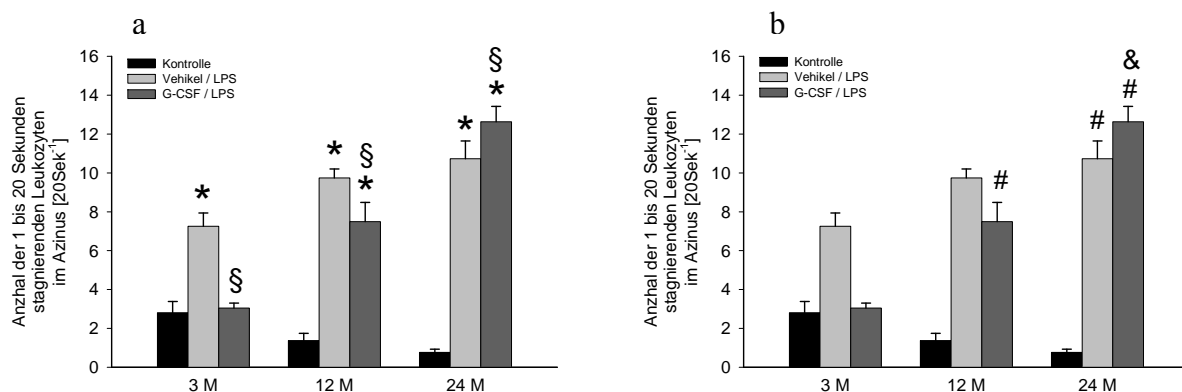
Eine alleinige LPS Gabe verursachte einen signifikanten Anstieg der längerfristig adhärenen Leukozyten in allen Altersgruppen. Im Vergleich zwischen den Altersgruppen zeigte sich nach LPS Expositon mit zunehmendem Alter eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl an längerfristig stagnierenden Leukozyten mit signifikanten Unterschieden bei den 24 Monate alten Tieren. Die Vorbehandlung mit G-CSF bewirkte bei allen Altersgruppen eine Reduktion der längerfristig stagnierenden Leukozyten im Azinus im Vergleich zu alleiniger LPS Stimulation, wobei die Werte jeweils signifikant über denen der Kontrollgruppen lagen (Abb. 37b).

### 7.3.2.3. Dauerhaft stagnierende Leukozyten

In den Kontrollgruppen nahm die Zahl der dauerhaft stagnierenden Leukozyten im Azinus mit zunehmendem Alter ab, jedoch ohne dass die Unterschiede signifikant wurden (Abb. 38a, b). Nach alleiniger Stimulation mit LPS kam es in allen Altersgruppen zu einem signifikanten Anstieg der dauerhaft stagnierenden Leukozyten gegenüber den

Kontrollgruppen (Abb. 38a, b). Altersabhängig existierte hier auch eine stetige, aber zwischen den Altersgruppen nicht signifikante Zunahme.

Nach G-CSF-Vorbehandlung kam es im Vergleich zu alleiniger LPS-Gabe bei den 3 Monate alten Tieren zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl an dauerhaft stagnierenden Leukozyten mit vergleichbaren Werten zur Kontrollgruppe. Bei den 12 Monate alten Tieren kam es bei der Gruppe G-CSF / LPS ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der dauerhaft stagnierenden Leukozyten im Vergleich zur Vehikel / LPS Gruppe, jedoch lagen die Werte noch immer signifikant über denen der Kontrollgruppe. Bei den 24 Monate alten Tieren hingegen kam es in der Gruppe G-CSF / LPS im Vergleich zu alleiniger LPS-Exposition zu einer signifikanten Zunahme der dauerhaft stagnierenden Leukozyten. Dieser Wert lag auch signifikant über dem Wert der übrigen Altersgruppen mit gleicher Vorbehandlung (Abb. 38a, b).

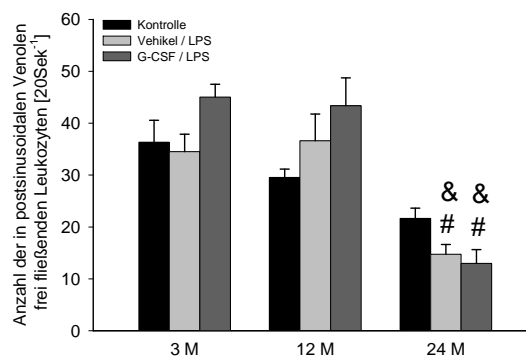


**Abbildung 38a, b:** Anzahl dauerhaft ( $> 20$  Sekunden) stagnierender Leukozyten im Azinus mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und innerhalb einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, \$  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

### 7.3.3. Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

#### 7.3.3.1. Frei fließende Leukozyten

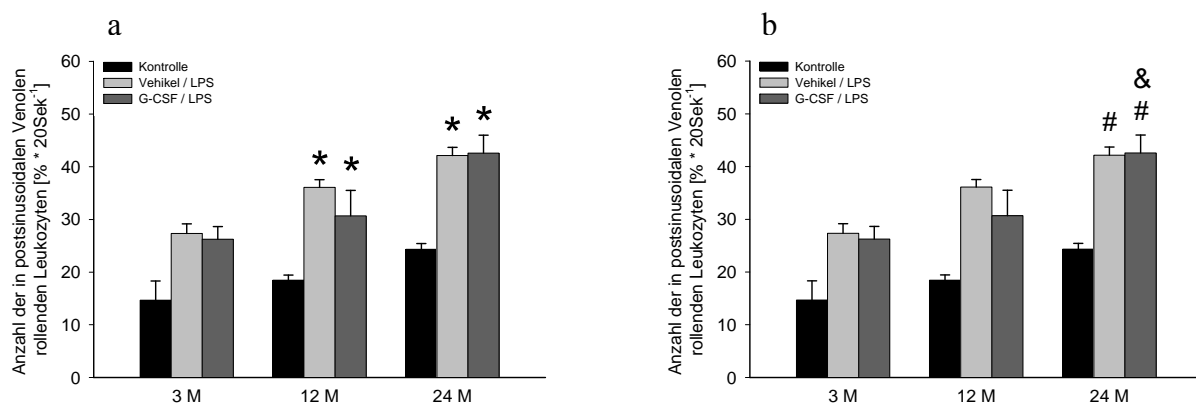
Die Anzahl der frei fließenden Leukozyten in der Venole nahm tendenziell in den Kontrollgruppen mit zunehmendem Alter ab. 6 Stunden nach LPS-Exposition war bei den 3 und 12 Monate alten Tieren keine signifikante Änderung dieser Anzahl zu finden. Nach zusätzlicher G-CSF-Vorbehandlung konnte bei beiden Altersgruppen ein nicht signifikanter Anstieg der Anzahl an frei fließenden beobachtet werden. Bei den 24 Monate alten Tieren war die Anzahl der frei fließenden Leukozyten sowohl in der Vehikel / LPS als auch in der G-CSF / LPS Gruppe in der Venole gegenüber den übrigen Altersgruppen signifikant vermindert (Abb. 39).



**Abbildung 39:** Anzahl frei fließender Leukozyten in postsinusoidalen Venolen der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, <sup>&</sup>  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

### 7.3.3.2. Rollende Leukozyten

In den Kontrollgruppen kam es altersabhängig zu einem moderaten Anstieg der rollenden Leukozyten in der postsinusoidalen Venole. LPS-Exposition bewirkte eine deutliche, jedoch nur bei den 24 Monate alten Tieren signifikante Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe des gleichen Alters. Nach G-CSF-Vorbehandlung kam es zu keinen Unterschieden gegenüber alleiniger LPS-Exposition (Abb. 40a, b).

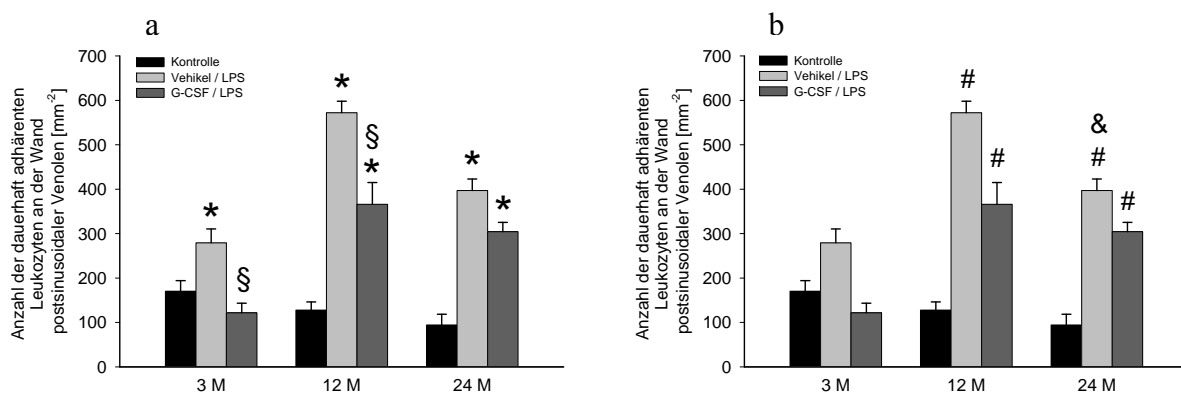


**Abbildung 40a, b:** Anzahl rollender Leukozyten in postsinusoidalen Venolen mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und innerhalb einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

### 7.3.3.3. Adhärenente Leukozyten

Die Anzahl an dauerhaft adhärenenten Leukozyten in postsinusoidalen Venolen nahm von den 3 bis zu den 24 Monate alten Tieren ab. LPS-Exposition steigerte diese Anzahl in allen Altersgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Auch war die Anzahl an dauerhaft adhärenenten Leukozyten nach LPS-Gabe bei den 12 Monate und 24 Monate alten Tieren signifikant höher als bei den 3 Monate alten Tieren. G-CSF Vorbehandlung bewirkte in allen Altersgruppen eine Reduktion der Anzahl adärenenter Leukozyten (Abb. 41a, b):

- Bei den 3 Monate alten Tieren nahm die Anzahl adhärenter Leukozyten wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe ab.
- Bei den 12 Monate alten Tieren kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme gegenüber alleiniger LPS-Stimulation, jedoch lagen die Werte noch signifikant über den Werten der Kontrollgruppe.
- Bei den 24 Monate alten Tieren zeigte sich nur ein nicht signifikanter Rückgang der Anzahl an adhärenter Leukozyten gegenüber der Vehikel/LPS-Gruppe und auch hier waren die Werte noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe.



**Abbildung 41a, b:** Anzahl dauerhaft adhärenter Leukozyten in postsinusoidalen Venolen mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und innerhalb einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

#### 7.3.3.4. Kupfferzellaktivität

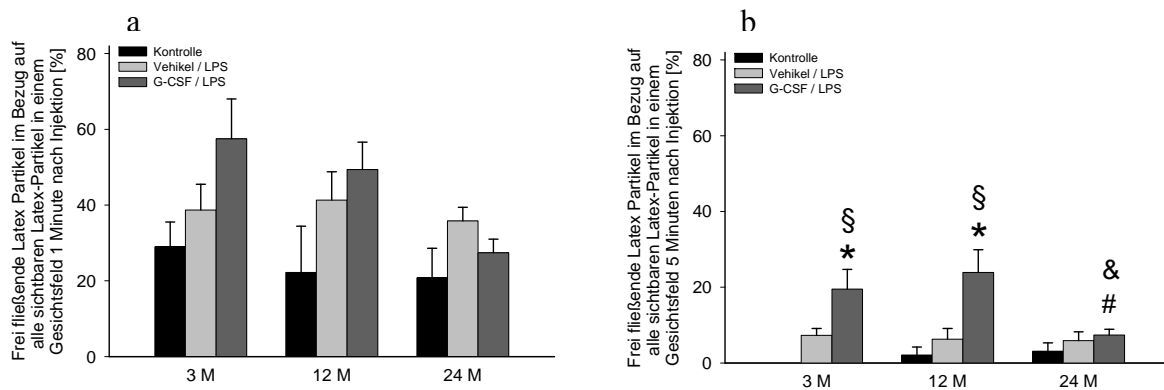
Die nach einer definierten Zeit nach Injektion noch frei fließenden Latexpartikel waren ein Marker für die Kupfferzellaktivierung.

Eine Minute nach Injektion der Latexpartikel sah man, dass LPS-Exposition die relative Anzahl an frei fließenden Latexpartikeln in allen Altersgruppen steigerte. Bei G-CSF-



Vorbehandlung vor LPS-Exposition war bei den 3 und 12 Monate alten Tieren diese Zahl weiter erhöht, bei den 24 Monate alten Tieren nahm sie eher ab (Abb. 42a).

5 Minuten nach Injektion erkannte man eine Zunahme der relativen Anzahl an noch frei fließenden Latexpartikeln in der Vehikel/LPS Gruppe im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei den 3 und 12 Monate alten Tieren konnte bei den G-CSF/LPS Gruppen eine jeweils signifikante Steigerung im Vergleich zu alleiniger LPS Exposition beobachtet werden. Bei den 24 Monate alten Tieren kam es nach G-CSF Vorbehandlung zu keinem Unterschied der relativen Anzahl an noch frei fließenden Latxpartikeln im Vergleich zu den Kontroll- oder Vehikel/LPS-Tieren (Abb. 42b).



**Abbildung 42a, b:** Relative Anzahl der frei fließenden Latexpartikel im Verhältnis zu allen sichtbaren Latexpartikeln in einem Gesichtsfeld zu den Zeitpunkten 1 Minute (a) und 5 Minuten (b) nach Injektion der Latexpartikel der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

## 7.4 Vollblut-, Blutserum- und Blutplasmaanalytik

### 7.4.1. Arterielle Blutgasanalyse, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahl

Die in der Blutgasanalyse der arteriellen Blutproben erhobenen Parameter unterschieden sich unabhängig von Alter oder Vorbehandlung nicht (Tab. 5).

		pO <sub>2</sub>	[mmHg]	sO <sub>2</sub>	[%]	pCO <sub>2</sub>	[mmHg]	pH	
<b>3 M</b>	Kontrolle	95	± 2,7	97	± 0,2	46	± 1,8	7,35	± 0,016
	Vehikel / LPS	113	± 4,5	97	± 0,4	42	± 1,7	7,35	± 0,015
	G-CSF / LPS	112	± 3,7	98	± 0,3	43	± 2,7	7,32	± 0,008
<b>12 M</b>	Kontrolle	87	± 5,4	95	± 0,8	54	± 9,3	7,34	± 0,016
	Vehikel / LPS	103	± 3,8	96	± 0,8	40	± 3,9	7,35	± 0,016
	G-CSF / LPS	103	± 7,1	95	± 1,4	44	± 2,1	7,33	± 0,009
<b>24 M</b>	Kontrolle	95	± 4,3	97	± 0,4	48	± 2,1	7,37	± 0,016
	Vehikel / LPS	109	± 5,1	98	± 0,2	47	± 2,5	7,34	± 0,017
	G-CSF / LPS	127	± 7,0	99	± 0,2	37	± 3,4	7,39	± 0,024

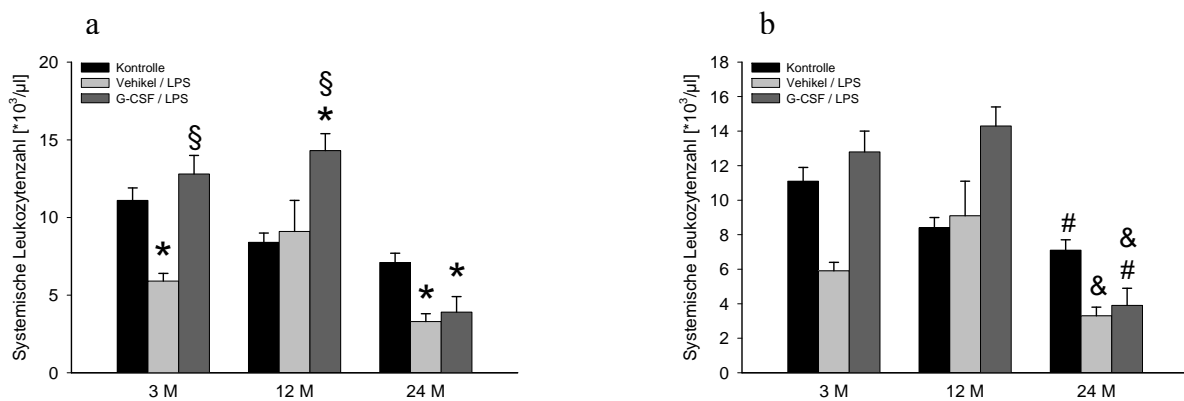
**Tabelle 5:** Ergebnisse der Blutgasanalyse aus arteriellen Blutproben der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS (n=6). Mittelwerte ± SEM.

Auch der systemische Hämatokrit unterschied sich nicht zwischen den Altersgruppen (Tab. 6). Der Hämatokrit nahm in den Gruppen Vehikel/LPS und G-CSF/LPS im Vergleich zu den Kontrollgruppen eher ab, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (Tab. 6).

		Hkt [%]		
<b>3 M</b>	Kontrolle	47	±	1,9
	Vehikel / LPS	42	±	1,6
	G-CSF / LPS	40	±	1,3
<hr/>				
<b>12 M</b>	Kontrolle	48	±	1,5
	Vehikel / LPS	45	±	2,4
	G-CSF / LPS	44	±	2,0
<hr/>				
<b>24 M</b>	Kontrolle	48	±	1,1
	Vehikel / LPS	41	±	1,8
	G-CSF / LPS	40	±	1,2

**Tabelle 6:** Hämatokrit der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS (n=6). Mittelwerte ± SEM.

Die systemische Leukozytenzahl nahm in den Kontrollgruppen mit zunehmendem Alter stetig ab und war im Alter von 24 Monaten signifikant niedriger als bei 3 Monate alten Kontrolltieren (Abb. 43a, b).



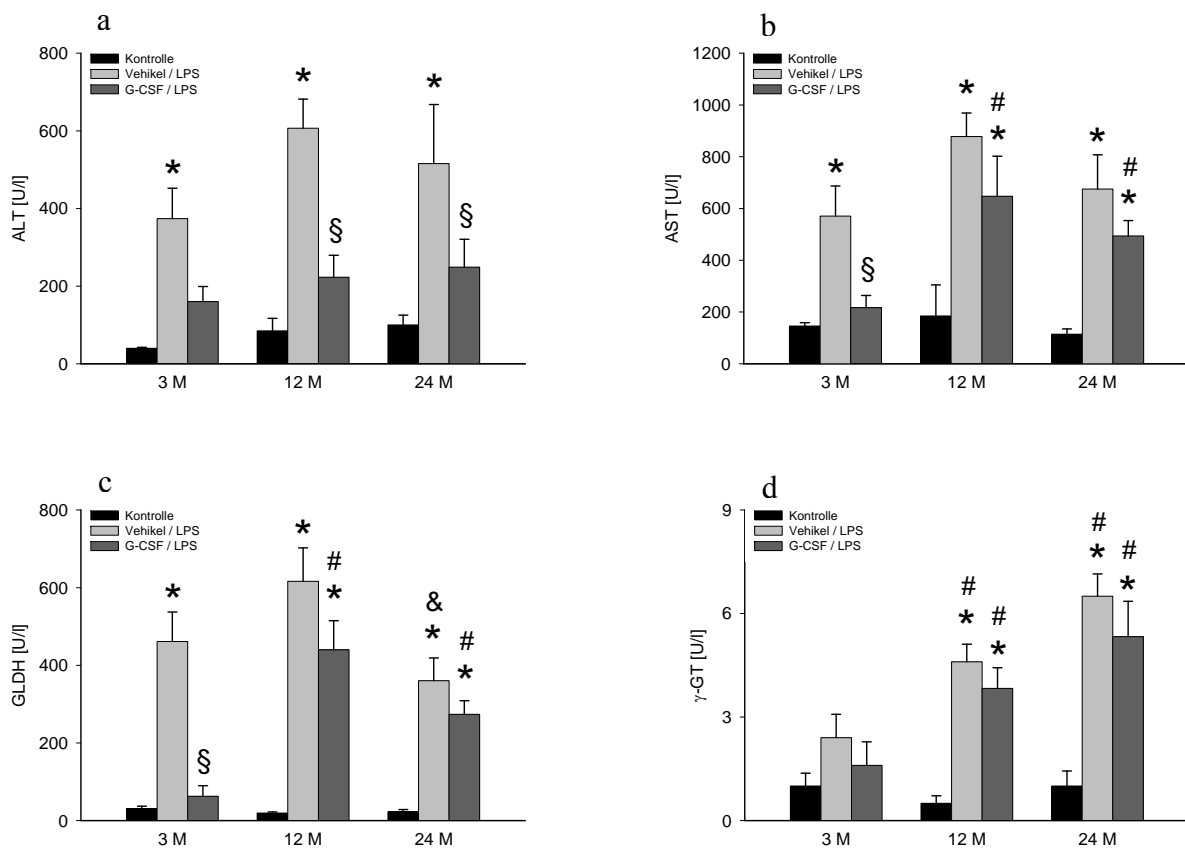
**Abbildung 43a, b:** Systemische Leukozytenzahl mit Angabe der Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe (a) und einer Behandlungsgruppe (b) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

Im Vergleich innerhalb der Altersgruppen kam es nach alleiniger LPS-Exposition bei den 3 Monate alten Tieren zu einer signifikanten Abnahme der systemischen Leukozytenzahl, ebenso auch bei den 24 Monate alten Tieren. Im Alter von 12 Monaten änderte sich nach LPS-Gabe die Leukozytenzahl nicht im Vergleich zu Kontrolltieren. In den G-CSF/LPS-Gruppen konnte sowohl bei den 3 als auch bei den 12 Monate alten Tieren eine signifikante Zunahme der Leukozytenzahl im Vergleich zu den Vehikel/LPS Gruppen beobachtet werden, nicht jedoch bei den 24 Monate alten Tieren (Abb. 43a).

Im Vergleich zwischen den Altersgruppen zeigte sich in der Gruppe der 24 Monate alten Tiere mit G-CSF- und LPS-Vorbehandlung ein signifikant niedrigerer Wert als bei den 3 und 12 Monate alten Tieren (Abb. 43b).

### 7.4.2. Aktivität der leberspezifischen Enzyme im Serum

In der Enzymdiagnostik als Marker für einen Organschaden der Leber zeigte sich in allen Altersgruppen nach alleiniger LPS-Exposition eine signifikante Zunahme aller gemessenen Enzyme (ALT, AST, GLDH und  $\gamma$ -GT) gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 44a-d). In den Gruppen G-CSF/LPS konnte eine signifikante Organprotektion, ersichtlich an den im Verhältnis zu den LPS-Gruppen deutlich niedrigeren Enzymkonzentrationen, beobachtet werden.



**Abbildung 44a, b, c, d:** ALT (a), AST (b), GLDH (c) und  $\gamma$ -GT (d) in den Blutseren der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

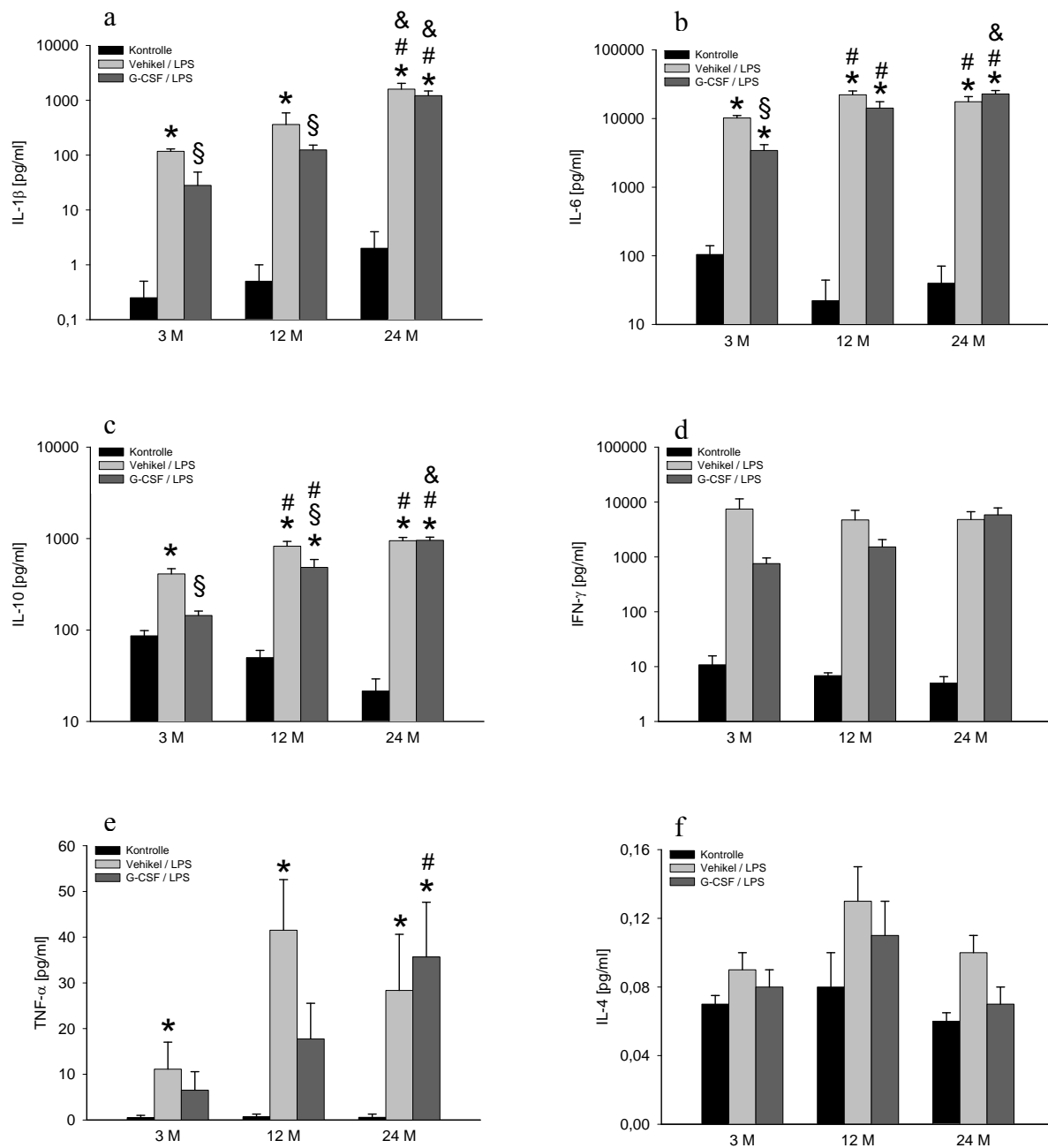
Bei den Werten von AST, GLDH und  $\gamma$ -GT wurden bei den 3-Monatstieren nach G-CSF-Vorbehandlung vergleichbare oder nur wenig erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Bei den 12 und 24 Monate alten Tieren hingegen waren bei diesen Parametern durch eine G-CSF-Vorbehandlung zwar eine Reduktion der Konzentrationen gegenüber der LPS-Gruppe erkennbar, jedoch lagen die Werte noch signifikant über denen der Kontrollgruppen und über denen der 3 Monate alten Tiere mit gleicher Vorbehandlung (Abb. 44a-d).

### 7.4.3. Systemische Zytokine und Chemokine

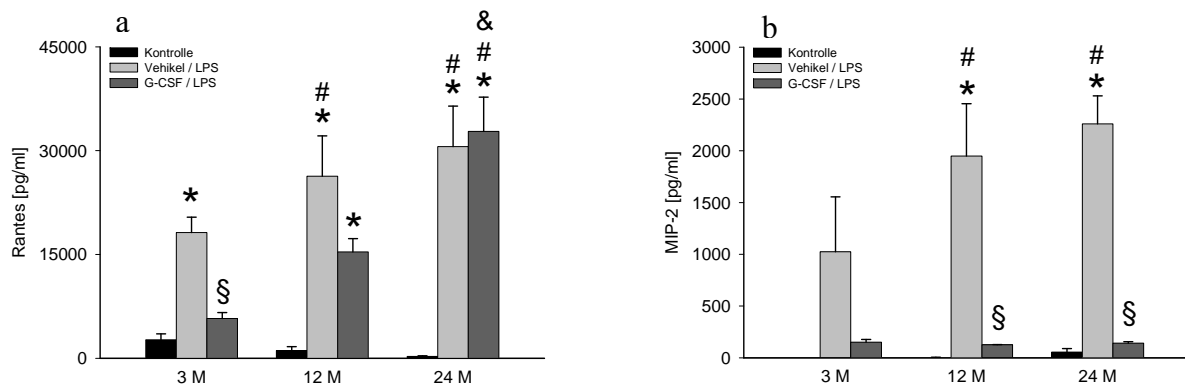
Die Analyse der im Blut gemessenen Zytokin-Konzentrationen ergab nach LPS-Exposition in allen Altersgruppen einen signifikanten Anstieg der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren. Zwar war auch bei den Zytokinen IL-4 und IFN- $\gamma$  eine Zunahme in diesem Vergleich zu erkennen, jedoch war dieser nicht signifikant (Abb. 45).

Nach G-CSF-Vorbehandlung und LPS-Exposition zeigte sich bei den 3 Monate alten Tieren in allen gemessenen Zytokinen eine Konzentrationsabnahme gegenüber alleiniger LPS-Gabe, jedoch waren die Unterschiede nur bei IL-1  $\beta$ , IL-6 und IL-10 signifikant. Auch bei den 12 Monate alten Tieren konnte durch G-CSF-Vorbehandlung eine Reduktion der Zytokin-Konzentrationen beobachtet werden. Bei den 24 Monate alten Tieren hingegen bewirkte die zusätzliche G-CSF-Vorbehandlung keine Konzentrationsabnahme der Zytokine (Ausnahme: IL-4), sondern eher eine Zunahme, vor allem von IL-6 (Abb. 45).

Lediglich Interleukin-4 zeigte in allen Altersklassen eine gleichförmige Antwort auf LPS-Stimulation bzw. G-CSF- und LPS-Vorbehandlung mit einem Rückgang der Konzentration nach G-CSF auch bei 24 Monate alten Tieren. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 45f).



**Abbildung 45a, b, c, d, e, f:** Analyse der im Blutplasma gemessenen Zytokine IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b), IL-10 (c), IFN- $\gamma$  (d), TNF- $\alpha$  (e) und IL-4 (f) der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS (n=6). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p < 0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p < 0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p < 0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.



**Abbildung 46a, b:** Analyse der im Blutplasma gemessenen Chemokine Rantes (a) und MIP-2 (b) im Blutplasma der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, §  $p<0,05$  vs. Vehikel/LPS in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung, &  $p<0,05$  vs. 12M mit gleicher Vorbehandlung.

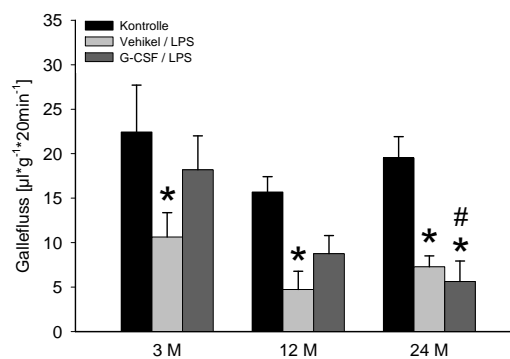
Bei Analyse der Chemokine konnte für Rantes eine wie bei den Zytokinen bereits beobachtete Verteilung erkannt werden (Abb. 46a). Die Kontrollgruppen unterschiedlichen Alters unterschieden sich nicht, jedoch konnte nach LPS-Gabe eine altersabhängige signifikante Zunahme der Rantes-Konzentration gesehen werden. Bei zusätzlicher G-CSF Vorbehandlung waren die Plasmakonzentrationen bei den 3 Monate alten Tieren wieder mit denen der Kontrolltiere vergleichbar und signifikant niedriger als nach alleiniger LPS-Stimulation. Bei den 12 Monate alten Tieren kam es zwar im Vergleich zu alleiniger LPS-Stimulation zu einer Abnahme der Rantes-Konzentration, jedoch lagen die Werte immer noch signifikant über denen der Kontrolltiere. Im Alter von 24 Monaten zeigte sich nach G-CSF-Präkonditionierung eher eine Zunahme der Rantes Konzentration gegenüber alleiniger LPS-Gabe.

Zwar zeigte sich auch beim Chemokin MIP-2 bei vergleichbaren Werten in den Kontrollgruppen eine signifikante altersabhängige Zunahme der Konzentrationen nach alleiniger LPS-Stimulation, jedoch waren die Werte in den entsprechenden G-CSF/LPS-Gruppen altersunabhängig gleichförmig wieder auf das Niveau der Kontrolltiere reduziert (Abb. 46b).



## 7.5 Gallefluss

Der Gallefluss als Parameter der exkretorischen Leberfunktion zeigte nach LPS-Exposition in allen Altersgruppen eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Kontrollgruppen des entsprechenden Alters. Nach zusätzlicher G-CSF-Präkonditionierung kam es bei den 3 und 12 Monate alten Tieren wieder zu einer Verbesserung des Galleflusses mit Werten, die zwar noch niedriger aber nicht signifikant unterschiedlich zu den altersentsprechenden Kontrolltieren waren (Abb. 47).



**Abbildung 47:** Galleproduktion im Verhältnis zum Gewicht der Tierleber und in Abhängigkeit von der Zeit der Tiere mit 3, 12 und 24 Monaten und den Behandlungsgruppen Kontrolle, Vehikel/LPS und G-CSF/LPS ( $n=6$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle in gleicher Altersgruppe, #  $p<0,05$  vs. 3M mit gleicher Vorbehandlung.

Bei den 24 Monate alten Tieren konnte nach G-CSF Vorbehandlung im Vergleich zu alleiniger LPS-Stimulation jedoch eine weitere Abnahme des Galleflusses gesehen werden, der sich sowohl signifikant von den 24 Monate alten Kontrolltieren als auch von den 3 Monate alten Tieren nach G-CSF / LPS Vorbehandlung unterschied.

## 7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 7.6.1 Systemische Parameter

Das Tiergewicht, die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Druck unterschieden sich altersabhängig, jedoch nicht zwischen den Behandlungsgruppen einer Altersstufe. Das Tiergewicht erreichte bei den 12 Monate alten Tieren das Maximum und nahm bis ins Alter von 24 Monaten wieder leicht, jedoch nicht signifikant ab. Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Druck (MAP) veränderten sich, wie auch beim Menschen bekannt. Die Herzfrequenz nahm mit zunehmendem Alter ab und erreichte mit 24 Monaten signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren, der MAP blieb in diesen Altersklassen, die als heranwachsend (3 Monate), erwachsen (12 Monate) und alt (24 Monate) eingeordnet waren, unverändert.

Sowohl die Parameter der Blutgasanalyse ( $pO_2$ ,  $sO_2$ ,  $pCO_2$ , pH) als auch der Hb-Gehalt des Blutes und der Hämatokrit unterschieden sich nicht zwischen den Alters- oder Behandlungsgruppen.

### 7.6.2 Hepatische Mikrozirkulation

Die relative Anzahl der perfundierten hepatischen Sinusoide nahm bei LPS-Exposition in allen Altersgruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren ab. Nach G-CSF-Präkonditionierung erreichte die Zahl an perfundierten Sinusoiden bei 3 und 12 Monate alten Tieren wieder Werte, die mit denen der entsprechenden Kontrolltiere vergleichbar waren, bei 24 Monate alten Tieren kam es hingegen zu einer weiteren Abnahme.

Die Anzahl der frei fließenden Leukozyten im Azinus war bei den 24 Monate alten Tieren in allen Behandlungsgruppen niedriger als bei den übrigen Altersstufen. Auch konnte bei den 24 Monate alten Tieren kein Unterschied zwischen den 3 Behandlungsgruppen gesehen werden. Bei den 3 und 12 Monate alten Tieren nahm hingegen die Zahl an frei fließenden Leukozyten nach G-CSF-Präkonditionierung gegenüber den übrigen Behandlungsgruppen leicht zu.

Dementsprechend war auch die systemische Leukozytenzahl im Blut bei den 24 Monate alten Tieren behandlungsunabhängig niedriger als bei den übrigen Altersgruppen. Auch hier war die Anzahl der Leukozyten nach G-CSF-Vorbehandlung bei den 3 und 12 Monate alten Tieren höher als bei den vergleichbaren Gruppen Kontrolle und Vehikel/LPS.

Die Anzahl an kürzer als 1 Sekunde stagnierenden Leukozyten im Azinus zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den Behandlungs- und Altersgruppen. Die Anzahl an Leukozyten, die 1 bis 20 Sekunden im Azinus stagnierte, veränderte sich in allen Altersgruppen gleichförmig mit einer signifikanten Zunahme nach alleiniger LPS-Stimulation und einer durch G-CSF-Präkonditionierung wieder leicht abnehmenden Anzahl, die jedoch immer noch signifikant über denen der Kontrolltiere lag.

Vergleichbar mit der Anzahl an frei fließenden Leukozyten im Azinus veränderte sich auch die Zahl an frei fließenden Leukozyten in der postsinusoidalen Venole. Die Anzahl der frei fließenden Leukozyten in der postsinusoidalen Venole war bei den 24 Monate alten Tieren in allen Behandlungsgruppen niedriger als in den übrigen Altersstufen. Auch konnte bei den 24 Monate alten Tieren kein Unterschied zwischen den 3 Behandlungsgruppen gesehen werden. Bei den 3 und 12 Monate alten Tieren nahm die Zahl an frei fließenden Leukozyten im Azinus nach G-CSF-Präkonditionierung gegenüber den übrigen Behandlungsgruppen eher zu.

Die Zahl der in postsinusoidalen Venolen rollenden Leukozyten nahm altersunabhängig nach LPS-Exposition im Vergleich zu den Kontrolltieren zu. Eine zusätzliche Präkonditionierung mit G-CSF veränderte diese Werte nicht.

Die dauerhaft an der Venolenwand postsinusoidaler Venolen adhärenenten Leukozyten nahmen nach LPS-Exposition in allen Altersgruppen signifikant gegenüber den Kontrolltieren zu. In den G-CSF/LPS-Gruppen war deren Anzahl bei den 3 Monatstieren wieder mit den Werten der Kontrolltiere vergleichbar. Bei den 12 Monate alten Tieren war diese Anzahl zwar noch höher als bei den entsprechenden Kontrolltieren, jedoch signifikant niedriger als bei alleiniger LPS-Exposition und bei den 24 Monate alten Tieren nur leicht gegenüber der Vehikel/LPS Gruppe vermindert.

### 7.6.3 Kupfferzellen

Die Anzahl an frei fließenden im Verhältnis zu schon von den Kupfferzellen phagozytierten Latexpartikeln 5 Minuten nach Injektion war bei den lediglich mit LPS-exponierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren altersunabhängig leicht erhöht. In den G-CSF/LPS-Gruppen kam es bei den 3 und 12 Monate alten Tieren zu einer signifikanten Verschiebung dieser Relation zugunsten der frei fließenden Partikel, bei den 24 Monate alten Tieren konnte in der G-CSF/LPS-Gruppe kein Unterschied zur Vehikel/LPS Gruppe gesehen werden.

### 7.6.4 Aktivität der leberspezifischen Enzyme

Die Aktivität der leberspezifischen Enzyme im Serum zeigte in allen mit LPS behandelten Gruppen einen deutlichen, meist auch statistisch signifikanten Anstieg gegenüber den Kontrolltieren der entsprechenden Altersgruppen. Eine altersabhängige Zunahme nach alleiniger LPS-Stimulation konnte bei der Aktivität der  $\gamma$ -GT gesehen werden. Nach Präkonditionierung mit G-CSF vor LPS-Exposition waren die Werte der ALT-Aktivität in allen Altersgruppen wieder auf den Wert der Kontrolltiere reduziert. In Bezug auf AST, GLDH und  $\gamma$ -GT wurden nach Präkonditionierung mit G-CSF bei den 3 Monate alten Tieren wieder vergleichbare Aktivitäten wie bei den Kontrolltieren erreicht. Bei den 12 und 24 Monate alten Tieren kam es zwar im direkten Vergleich mit den Gruppen Vehikel/LPS der entsprechenden Altersgruppe zu einer Abnahme der Aktivitäten von AST, GLDH und  $\gamma$ -GT, jedoch lagen diese Werte immer noch signifikant über denen der Kontrollgruppen.

### 7.6.5 Zytokine und Chemokine

Nach LPS-Exposition konnte bei Tieren aller Altersgruppen eine Zunahme der gemessenen Zytokinkonzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beobachtet werden, die außer bei IFN- $\gamma$  auch statistisch signifikant war. Bei einer zusätzlichen Präkonditionierung mit G-CSF nahm die Zytokinkonzentration der oben genannten Zytokine bei jungen Tieren im Vergleich zu alleiniger LPS-Behandlung wieder ab. Diese Reduktion war signifikant mit Ausnahme von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Bei alten Tieren sah man nach G-CSF-Präkonditionierung keine Reduktion der durch LPS erhöhten Plasmakonzentrationen, bei TNF- $\alpha$  sogar eine Zunahme. IL-4 zeigte in allen Altersgruppen einen gleichförmigen Verlauf der Zytokinkonzentrationen mit einer nach LPS erhöhten Konzentration und nach G-CSF Vorbehandlung wieder einer leichten Abnahmen. Alle Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Die Chemokine Rantes und MIP-2a zeigten bei vergleichbaren Konzentrationen bei allen Kontrolltieren einen altersabhängigen signifikanten Anstieg nach LPS Stimulation im Plasma. Die Plasmakonzentration von MIP-2 nahm in allen Altersgruppen vergleichbar nach G-CSF-Vorbehandlung wieder ab mit Werten die denen der Kontrolltiere entsprach. Rantes fand sich bei den 3 Monate alten Tieren durch G-CSF-Präkonditionierung signifikant gegenüber der Gruppe Vehikel/LPS vermindert mit vergleichbaren Werten zur Kontrollgruppe. Bei 12 Monate alten Tieren kam es zwar nach G-CSF-Präkonditionierung noch zu einer Reduktion der Konzentration von Rantes im Vergleich zur Vehikel/LPS Gruppe, aber die Werte lagen noch deutlich über denen der Kontrollgruppe, und bei den 24 Monate alten Tieren kam es sogar zu einer Zunahme der Plasmakonzentration.

## 8. Diskussion

### 8.1. Diskussion des Modells

Die vorliegende Studie diene (i) der detaillierten Analyse der intravitalen physiologischen Veränderungen der hepatischen Morphologie, Mikrozirkulation und Funktion mit zunehmendem Alter und (ii) der Analyse der durch LPS induzierten Sepsis in einem altersgestaffelten Tiermodell anhand der hepatischen Mikrozirkulation und der systemischen Zytokinantwort sowie deren Modulierbarkeit durch G-CSF.

Die Experimente wurden an spontanatmenden, anästhesierten und laparotomierten Ratten durchgeführt.

Untersuchungen pathophysiologischer Mechanismen innerhalb der hepatischen Mikrozirkulation können grundsätzlich anhand isolierter Zellen bzw. Zellkulturen (BADGER, 1986; KNITTEL et al, 1996; SENOO et al, 1990; SHIRATORI et al, 1987), an isoliert perfundierten Organen (GRIFFEN, Jr. et al, 1970; KONNO et al, 1992; VARIN et al, 1985) oder an intakten Organismen (BAUER et al, 1994; MENGER et al, 1992; SEIFERT et al, 1995; VOLLMAR et al, 1994b; VOLLMAR et al, 1996b; VOLLMAR et al, 1997; VOLLMAR et al, 1998b; VOLLMAR et al, 1995) vorgenommen werden. Dabei sollte die Wahl des Modells problembezogen, das heißt abhängig von den der Studie zugrundeliegenden Fragestellungen und Hypothesen, erfolgen. Studien zur Aufklärung spezifischer zellulärer Mechanismen (KNITTEL et al, 1996; RENSING et al, 2004; SENOO et al, 1990; SHIRATORI et al, 1987) oder Zell-Zell-Interaktionen (SHIRATORI et al, 1986; XU et al, 1996) erlauben durch die Reduktion des Modells auf isolierte Zellen, Zellverbände, Gewebe oder Organe eher eine Analyse kausaler Wirkungs-Beziehungen. Der Nachteil dieser Modelle liegt jedoch in der mangelhaften Berücksichtigung der innerhalb eines Organismus typischen Interaktionen zwischen den einzelnen Organsystemen, welche durch makro- und mikrozirkulatorische Regelkreise, neuronale Steuerungsmechanismen, metabolische Faktoren sowie humorale Kaskadensysteme vermittelt werden (MCCUSKEY, 1983). *In vivo* Modelle, wie das in der vorliegenden Arbeit gewählte, berücksichtigen demgegenüber die interferierenden lokalen und systemischen, positiven sowie negativen Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer

oder pathophysiologischer Prozesse (BUSCH et al, 2004; VOLLMAR et al, 1996b; VOLLMAR et al, 1997).

Das in dieser Studie praktizierte chirurgische Modell beinhaltete nach Induktion einer Narkose über ein intraperitoneal appliziertes Barbiturat die Laparotomie der Versuchstiere, die Präparation der Leber sowie die Auslagerung des linken Leberlappens zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Hierbei besteht die Möglichkeit einer gravierenden Beeinträchtigung der Leberdurchblutung infolge des unabdingbaren chirurgischen Traumas (GELMAN, 1987; GELMAN et al, 1987; NAGANO et al, 1990) mit der Folge einer iatrogenen parenchymatösen Schädigung. Untersuchungen zur Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie sind allerdings am nicht anästhesierten, nicht laparotomierten Tier aus methodischer Sicht nicht durchführbar. Die in dieser Studie vorgenommenen Bestimmungen der Leberenzyme ergaben jedoch, ebenso wie die Beurteilung der lichtmikroskopischen Präparate, keinen Hinweis auf einen funktionellen oder strukturellen Leberschaden innerhalb der Kontrollgruppe. Darüber hinaus betrug die sinusoidale Perfusionsrate unter Kontrollbedingungen fast 100%, was ebenfalls physiologischen Verhältnissen nahekommen dürfte (MENGER et al, 1991; POST et al, 1993).

Aus diesen Gründen wurde besonders auf eine schonende chirurgische Präparation und Auslagerung des zu mikroskopierenden Leberlappens geachtet. Die Tiere wurden zur Intravitalmikroskopie um 45° in der Sagittalebene nach links geneigt, so dass der linke Leberlappen lediglich um weitere 45° rotiert werden musste, um sich einem der Leberoberfläche entsprechenden Plastilinbett anzupassen. Eine Beeinträchtigung der Perfusion durch übermäßigen Zug oder Torsion am Gefäßstiel konnte somit vermieden werden. Bei der Auslagerung kam der linke Leberlappen, mit der Unterseite nach oben, exakt horizontal in Herzhöhe des Versuchstieres zu liegen. Hierdurch wurde ein hydrostatischer Effekt, der die hepatische Mikrozirkulation und den venösen Rückstrom zum Herzen beeinflusste, ausgeschlossen und eine minimale Atemverschieblichkeit der Leber garantiert.

Die Präkonditionierung bzw. Vorbehandlung der Versuchstiere erfolgte in einer kurzdauernden Ätherdampfnarkose. Da der hierfür verwendete Diethylether eine Reizung von Schleimhäuten im Respirationstrakt mit stark vermehrter Bronchialsekretion verursacht (BUDNIEWSKI, 1975), wurde bei der Narkoseinduktion zur chirurgischen Präparation hierauf verzichtet. Die Substanzen der Vorbehandlung (Vehikel, G-CSF und LPS) wurden beim mit Äther narkotisierten Tier über die Schwanzvene injiziert, und nach einer kurzen

Aufwachphase wurde das Tier für die Dauer des Vorbehandlungszeitraumes wieder in den Käfig verbracht.

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur Induktion einer Sepsis bzw. Endotoxinämie. Eine Möglichkeit ist das tierexperimentelle „Cecal Ligation and Puncture“-Modell, bei dem durch einen tatsächlichen Übertritt von Mikroorganismen in das Blut eine Sepsis induziert wird (HYDE et al, 1990; HYDE et al, 1992; REMICK et al, 2000), aber auch die Induktion der Sepsis durch intravenöse Injektion von Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien (ESMON, 2004; MAYER et al, 1991; REMICK et al, 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht auch in der Injektion von Peptidoglycanen gram-positiver Bakterien zur Sepsisinduktion (RIETSCHEL et al, 1998; WANG et al, 2004) bzw. die Kombination von Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien und Peptidoglycan gram-positiver Bakterien (DUGO et al, 2005). Alle Verfahren haben sicherlich gemeinsam, dass die Ergebnisse im Tiermodell nicht unmittelbar auf den Mensch übertragen werden können (ESMON, 2004). So zeigten vielversprechende Anti-Zytokin-Strategien, die im Tiermodell ein verbessertes Outcome bewirkten, beim Menschen wenig Erfolg (MINNICH et al, 2004; VAN DER et al, 1999).

Für unsere Studie wählten wir die technisch verhältnismäßig einfach durchzuführende Injektion von Lipopolysaccharid in ein peripheres Gefäß (Schwanzvene). Die gewichtsadaptierte Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht entspricht der in der Literatur gängigen Dosierung (IIMURO et al, 1994; RUTTINGER et al, 1998; VOLLMAR et al, 1996b; WRAY et al, 2001). Der gewählte Zeitraum von 6 Stunden zwischen Induktion der Endotoxinämie und Intravitalmikroskopie der hepatischen Mikrozirkulation basiert auf Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass 6 Stunden nach LPS-Injektion der lokale hepatische Schaden mit Störung der Mikrozirkulation, Leukozytenaktivierung und exkretorischer Leberfunktionseinschränkung deutlich ausgeprägt ist (THIJS et al, 1995).

Der in unserer Studie gewählte zeitliche Abstand von 1 Stunde zwischen G-CSF-Präkonditionierung und Sepsisinduktion durch LPS resultiert aus Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, in denen bereits eine Protektion der hepatischen Mikrozirkulation bei 3 Monate alten septischen Ratten beobachtet werden konnte (VOLLMAR et al, 1997). Die Dosis des intravenös applizierten G-CSF (200µg/kg Körpergewicht) richtete sich nach Dosisfindungsuntersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Wendel an septischen Nagetieren. Dort konnte gezeigt werden, dass die Mortalität nach Vorbehandlung mit 250µg/kg Körpergewicht G-CSF und anschließender Sepsisinduktion signifikant reduziert



---

war (GORGEN et al, 1992; VOLLMAR et al, 1997). Diese tierexperimentell genutzte G-CSF Dosis liegt jedoch weit über den beim Menschen gebräuchlichen Dosierungen. So wird bei durch Chemotherapie induzierter Neutropenie eine Dosierung von 5µg/kg/d Körpergewicht und zur adjuvanten Therapie der Sepsis eine Dosierung von 1µg/kg/d Körpergewicht empfohlen (LUFTNER et al, 2005; WEISS et al, 1999; WEISS et al, 2003). Unterschiedlich ist jedoch auch das Einsatzspektrum, denn beim Menschen wird G-CSF zur Therapie genutzt, in den von uns vorgestellten Ergebnissen zur Vorbehandlung. Insofern sind die Dosierungen auf einen anderen Effekt ausgelegt und müssen daher auch nicht unbedingt vergleichbar sein.

## 8.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Als Untersuchungsmethode der hepatischen Morphologie und Mikrozirkulation diene die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Geschichtlich lässt sich der Einsatz von Mikroskopen zur Erforschung mikrozirkulatorischer Phänomene bis in die Zeit Marcello Malpighis, der 1661 das Kapillarbett als Verbindung des arteriellen und venösen Gefäßsystems entdeckte, und Antony van Leuwenhooks zurückverfolgen, der bereits 1674 die kapilläre Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten studierte (SLAAF, 1986). Seit dieser Zeit dienen mikroskopische *in vivo* Studien der Untersuchung von Struktur und Funktion des mikrovaskulären Gefäßbetts sowie des Parenchyms zahlreicher Organe, wobei die Intravitalmikroskopie als sogenannte direkte Technik die Möglichkeit bietet, dynamische Phänomene über einen längeren Zeitraum detailliert qualitativ und quantitativ zu analysieren (MENGER et al, 1991; VOLLMAR et al, 1998a; ZEINTL et al, 1986). Auf dieser Eigenschaft basieren auch die Vorteile und die prinzipielle Überlegenheit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie in der Betrachtung der Mikrozirkulation im Vergleich mit indirekten Verfahren, wie z.B. der Laser-Doppler-Flowmetrie, der Radiogoldpartikel-Clearance-Technik, der <sup>99m</sup>Tc-Szintigraphie, der <sup>125</sup>I-Albumin-Szintigraphie, der histologischen Analyse von injizierten Kohlenstoffpartikeln oder der Elektronenmikroskopie.

Prinzipiell ist die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation mittels Epi-Illumination (Auflicht) oder Trans-Illumination (Durchlicht) möglich (MCCUSKEY, 1986; SLAAF et al, 1986). Frühe intravitalmikroskopische Untersuchungen nutzen dabei vornehmlich die Trans-Illuminations-Technik (BLOCH, 1955; HANZON, 1952; KNISELY, 1939). Im Falle der Leber kann mit dieser Methode jedoch nur der äußere Rand eines Leberlappens beurteilt werden, so dass die Analyse größerer Areale mit zahlreichen Azini nicht möglich ist und die innerhalb eines Experiments zu erhebenden Daten daher limitiert sind. Darüber hinaus berichten Untersuchungen mittels Trans-Illuminations-Technik (EGUCHI et al, 1991) unter physiologischen Bedingungen von einer niedrigeren sinusoidalen Perfusionsrate als Studien, welche sich der Epi-Illuminations-Technik bedienen (POST et al, 1993; VOLLMAR et al, 1993). Die im Rahmen der Trans-Illumination unabdingbare Untersuchung des äußeren Leberrandes beinhaltet das Risiko einer präparationsbedingten, mechanischen Alteration des Organs. Außerdem besteht eine erhöhte Gefahr der Austrocknung des dünnen äußersten Leberrandes während der Mikroskopie. Aus diesen Gründen verwendeten wir in der vorliegenden Studie die Epi-Illuminations-Technik, welche die Visualisierung der Mikrozirkulation an der Oberfläche solider Organe ermöglicht. Dabei

konnte davon ausgegangen werden, dass an der Leberoberfläche zu beobachtende pathophysiologische Prozesse sich nicht von den im Inneren des Organs ablaufenden Prozessen unterscheiden (RAPPAPORT, 1958).

Die nur geringe Autofluoreszenz der Leber (HANZON, 1952) erforderte die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Kontrastverstärkung (VOLLMAR et al, 1994c; VOLLMAR et al, 1996a). Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse diente der Farbstoff Natrium-Fluoreszein, der zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen i.v. appliziert wurde. In der geeigneten Dosis ( $2\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht) wurde damit eine optimale Kontrastverstärkung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erzielt, d.h. die Sinusoide blieben über ihren gesamten Verlauf innerhalb des Azinus von periportal bis perizentral gut visualisierbar. Die Markierung der Leukozyten erfolgte mittels Rhodamin-6G, welches in adäquater Dosierung ( $0.01\mu\text{mol/100g}$  Körpergewicht i.v.) eine ausreichende Detektion der fließenden und stagnierenden Leukozyten ermöglichte (BAATZ et al, 1995). Eine wiederholte Gabe des Farbstoffes, wie sie bei anderen Leukozyten-Markern (z.B. Acridin-Orange) unerlässlich ist, war im Falle von Rhodamin-6G nicht notwendig. Mithilfe der Injektion von  $1,1\mu\text{m}$  durchmessenden Latex-Partikel, die von den sessilen Makrophagen der Leber (Kupfferzellen) phagozytiert werden, konnte sowohl eine statische Auswertung der Anzahl und Verteilung der sessilen Makrophagen in der Leber erfolgen, wie auch die Dynamik der Phagozytosegeschwindigkeit dieser Partikel durch die Kupfferzellen erfasst werden (DAN et al, 1985; VOLLMAR et al, 1994b; VOLLMAR et al, 1996b; VOLLMAR et al, 1997).

Durch die Anwendung von diversen Fluoreszenzfarbstoffen stellt die Intravitalmikroskopie eine einzigartige Methode dar, welche die Visualisierung unterschiedlicher physiologischer und pathophysiologischer Aspekte erlaubt. Potenziell ist die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen wie Rhodamin-6G denkbar (BEREITER-HAHN et al, 1983; DIETZMANN et al, 1987; HIGUTI et al, 1980). In der gewählten Dosis sind jedoch pharmakologisch-toxische Eigenschaften des Farbstoffes, z.B. eine Störung der Atmungskette, unwahrscheinlich (EGUCHI et al, 1991). Des weiteren kann eine längere Lichtexposition des Gewebes während der Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren. Deshalb wurde die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf maximal 60 Sekunden und die Gesamtdauer der Mikroskopie auf das notwendige Minimum beschränkt (MENGER et al, 1991). Bei der Auswahl der Gesichtsfelder wurde insbesondere darauf geachtet, nicht in unmittelbarer Nähe

eines bereits belichteten Areal zu mikroskopieren, was sich aufgrund der zur Verfügung stehenden Leberoberfläche von ungefähr 7 cm<sup>2</sup> ausgezeichnet realisieren ließ.

Die Vielzahl und Komplexität der intravitalmikroskopisch erfassbaren Phänomene macht eine "on-line"-, d.h. Echtzeit-Analyse der Lebermorphologie und -mikrozirkulation unmöglich, so dass eine Dokumentation der mikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hochauflösenden CCD-Kamera (HIRAOKA et al, 1987) und einer Videoaufzeichnungseinheit (ELLIS, 1986; ELLIS et al, 1992; MCCUSKEY, 1986) unerlässlich war. Die Quantifizierung der einzelnen Parameter konnte somit nach Beendigung der Experimente durch wiederholte Analyse der einzelnen, auf Videoband gespeicherten, Bildsequenzen erfolgen. Dabei konnten mittels Zeitlupe, Bild-zu-Bild-Analyse oder Standbilder auch komplexe, rasch ablaufende Vorgänge im Detail erfasst werden (ELLIS, 1986; MENGER et al, 1991).

Die "off-line"-Auswertung der Videosequenzen kann sowohl manuell mittels Bild-zu-Bild-Analyse, als auch computergestützt erfolgen (ELLIS, 1986; INTAGLIETTA et al, 1975). Eine digitalisierte Analyse mittels Computer-Video-System bietet vor allem den Vorteil einer wesentlich rationelleren Quantifizierung der Parameter, wodurch in kurzer Zeit eine sehr große Datenmenge verarbeitet werden kann (ELLIS, 1986). Die prinzipiellen Probleme der computergestützten Video-Analyse bestehen in der Notwendigkeit einer konsequent hohen Bildauflösung der zu untersuchenden Objekte sowie in der Beeinflussung der Auswertung durch Bewegungsartefakte (ZEINTL et al, 1986). Obwohl automatisierte Verfahren zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation in den vergangenen Jahren bereits Verwendung fanden (SHERMAN et al, 1990; SHERMAN et al, 1986), ergeben sich jedoch gerade im Falle der Intravitalmikroskopie der Leber Schwierigkeiten aufgrund der Atemexkursionen, welchen das Organ indirekt über das Zwerchfell ausgesetzt ist. Da wir in dem von uns gewählten Modell aus Gründen der Komplexität der zu untersuchenden Parameter und des enormen Umfangs der erhobenen Daten eine computergestützte Analyse der Lebermorphologie und -mikrozirkulation anstrebten, war eine sorgfältige chirurgische Präparation zur Vermeidung jeglicher Bewegungsartefakte notwendig. Eine Minimierung der Übertragung von Atembewegungen und Herzaktionen auf die Leber wurde durch sorgfältige Mobilisation und Auslagerung des linken Leberlappens auf eine mittels Plastillinmasse der Leberoberfläche genau angepassten Metallschale erreicht. Dies gewährleistete eine suffiziente Ruhigstellung der Leber zur computergestützten Analyse.

Zur quantitativen „off-line“-Auswertung der einzelnen Videosequenzen wurde jeweils ein elliptisches Overlay als Schablone auf den Bildschirm gelegt, welches in Größe und Form einen Azinus - als kleinste strukturelle und funktionelle Baueinheit der Leber (RAPPAPORT et al, 1954) - repräsentierte. Sechs solcher Azini, zirkulär um die drainierende Zentralvenole angeordnet, entsprechen dem Baumuster des „klassischen“ hexagonalen Leberläppchens oder sogenannten „complex acinus“ (RAPPAPORT, 1958). Somit wird die Umrechnung der anhand eines Overlays gewonnenen Daten auf die Fläche eines Leberläppchens ermöglicht. Des weiteren erlaubt die Verwendung elliptischer Overlays eine Unterteilung des Azinus in drei Segmente gleicher Länge (RAPPAPORT, 1973), wodurch alle analysierten Parameter getrennt für die subazinären Regionen periportal, midzonal und perizentral zu erheben sind. Diese Vorgehensweise erlaubt eine detaillierte, quantitative und hinsichtlich der Lokalisation aller beobachteten Phänomene differenzierte Analyse der hepatischen Mikrozirkulation, welche bereits in vergleichbaren Studien etabliert wurde (MENGER et al, 1991; POST et al, 1993; VOLLMAR et al, 1993; VOLLMAR et al, 1994c).

Zur Evaluation der Anzahl, Verteilung und Aktivität von hepatischen Sternzellen bestimmten wir die Zell-Dichte im Lebergewebe der Versuchstiere indirekt durch quantitative Analyse der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz. Diese ist in ihrer Intensität von der Zahl der vorhandenen Ito-Zellen sowie von deren Vitamin A-Gehalt abhängig (SUEMATSU et al, 1993; VOLLMAR et al, 1998b). Des weiteren wurde die Abbleichzeit der Vitamin A-assoziierten Autofluoreszenz in Ito-Zellen als Indikator für Veränderungen des Vitamin A-Gehaltes bestimmt. Diese korreliert nur mit dem Vitamin A-Gehalt der Ito-Zellen (SUEMATSU et al, 1993). Weiterhin analysierten wir intravital mikrozirkulatorische Veränderungen sowohl im Rahmen der physiologischen Altersentwicklung der Versuchstiere wie die Größenänderung anatomischer Strukturen e.g. der azinären Größe (BLECHMAN et al, 1999; DRUGAS et al, 1993), als auch altersabhängig in der Modulation der Sepsis e.g. die sinusoidalen Perfusionsausfälle im Azinus (VOLLMAR et al, 1994a; VOLLMAR et al, 1996a). Einen weiteren Schwerpunkt legten wir auf die Erfassung der Modulation der Entzündungsreaktion durch Induktion einer Sepsis mit oder ohne zusätzliche G-CSF-Präkonditionierung. Hierzu analysierten wir neben der Gesamtzahl der Leukozyten auch ihr Fließverhalten nach Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G (VOLLMAR et al, 1994c). Die Intravitalmikroskopie erlaubte außerdem eine Untersuchung der Rolle der Kupfferzellen im Rahmen der Sepsis (VOLLMAR et al, 1997; VOLLMAR et al, 1996b). Hierzu wurde, nach Injektion von Latex-Partikeln, die Phagozytose-Aktivität der

Kupfferzellen, welche von der Zahl der vorhandenen Kupfferzellen und von ihrem Aktivierungszustand abhängig ist, und deren Gesamtzahl pro Azinus bestimmt.

Es erfolgte darüber hinaus die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes im Lebergewebe mittels HPLC, einer in der Literatur über die Jahre hinweg immer wieder verwendeten und gut evaluierten Methode zur Quantifizierung löslicher Substanzen (HENDRIKS et al, 1985; HENDRIKS et al, 1987; SHINTAKU et al, 1998; YAMANE et al, 1993). Im Zuge dieser Analysen konnten weitere wertvolle Informationen über die Anteile der wichtigsten Vitamin A-Speicherformen am Gesamt-Vitamin A-Gehalt der Leber gewonnen werden (HENDRIKS et al, 1985; HENDRIKS et al, 1987).

Als Maß der durch Sepsisinduktion verursachten Leberschädigung wurde auch die Aktivität leberspezifischer Transaminasen im Serum bestimmt. Eine vermehrte Freisetzung dieser Enzyme mit messbarer Aktivitätserhöhung im Serum erfolgt im Rahmen pathophysiologischer Prozesse, welche mit einer Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität einhergehen (SCHMIDT et al, 1987). Insbesondere zeigen sich mit der Schwere der Leberschädigung korrelierende Serumaktivitäten von Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) (SCHMIDT et al, 1987; VOLLMAR et al, 1996b). Zytosolische Enzyme (z.B. ALAT) und Ekto-Enzyme der Plasmamembran wie  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) oder Alkalische Phosphatase (AP) gelangen bereits bei leichteren Zellschäden in den extrazellulären Raum mit Zunahme der entsprechenden Aktivität im Serum (SCHMIDT et al, 1987). Ein Anstieg der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), welche innerhalb der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist, kann als schwere, die Mitochondrien einbeziehende Zellschädigung aufgefasst werden (SCHMIDT et al, 1987). Darüber hinaus kann aus der Änderung des Enzymmusters von ASAT und ALAT auf die Schwere der Leberschädigung zurückgeschlossen werden. Während die ALAT ein ausschließlich zytoplasmatisches Enzym darstellt, ist die ASAT sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert (KAMIIKE et al, 1982). Leichtere Zellschäden verursachen somit die Freisetzung von ALAT und der zytoplasmatischen ASAT; erst bei ausgeprägter Schädigung wird auch die Aktivität der mitochondrialen ASAT ansteigen, wodurch sich das Verhältnis ASAT/ALAT hin zu größeren Werten verschiebt (KAMIIKE et al, 1982; NISHIMURA et al, 1986).

Als Parameter der hepatozellulären Exkretionsfunktion, welche ausschließlich *in vivo* direkt erfasst werden kann, wurde der Gallefluss während eines Zeitraums von max. 60 Minuten quantifiziert. Hierzu wurde die Galle über einen in den Ductus choledochus

eingebrauchten Polyethylenkatheter drainiert, in einer Einwegspritze gesammelt und anschließend gewogen (RUTTINGER et al, 1996). Da die Menge der Gallenflüssigkeit sowohl von der Zeit, über welche sie gesammelt wurde, als auch von der individuell verschiedenen Masse des Lebergewebes abhängig ist, wurde eine Standardisierung der Gallenexkretion vorgenommen. Diese erfolgte nach SUMIMOTO et al. (SUMIMOTO et al, 1988)) unter der Annahme eines spezifischen Gewichtes von 1g/ml Gallensekret in Mikrolitern pro Minute und Gramm Lebergewicht ( $\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ ).

Zur Beurteilung der in der Sepsis ablaufenden Entzündungskaskade wurden sowohl proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Zyto- und Chemokine mittels ELISA-Technik aus dem Blutplasma der Versuchstiere bestimmt. Die entsprechenden Blutproben wurden zum Versuchsende, ca. 7 Stunden nach LPS-Injektion, abgenommen. Nach dieser Zeitspanne ist die initiale Freisetzung der Zytokine bereits abgeschlossen (THIJS et al, 1995). Bei Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinkonzentrationen zugunsten der Proinflammation ist auch von einer stärkeren proinflammatorischen Zellantwort des Immunsystems auszugehen (GIROIR, 1993; REMICK et al, 1990; ROILIDES et al, 1992). Da der vorhandene Schaden des Gesamtorganismus in der Sepsis zu einem großen Teil durch das eigene Immunsystem verursacht wird (CAVAILLON et al, 2003; GIROIR, 1993; ROUX P., 2004), ist somit auch von einer stärkeren Schädigung auszugehen, die durch die oben bereits beschriebenen intravitalmikroskopischen und laborchemischen Parameter erfasst werden kann.

### 8.3. Diskussion der physiologischen Altersunterschiede in der Rattenleber

Es gab 3 entscheidende Gründe für die Wahl dieses Tiermodells:

1. In der Vergangenheit wurden viele Erkenntnisse über die physiologische und pathophysiologische Mikrozirkulation anhand der Intravitalmikroskopie der Rattenleber gewonnen. Altersabhängige Veränderungen wurden allerdings nicht untersucht.
2. Für einen großen Anteil der gerontologischen Untersuchungen werden Ratten als Versuchstiere genutzt.
3. Im Rahmen unseres Modellvorhabens wollte unsere Arbeitsgruppe pathophysiologische Unterschiede in einem altersgestaffelten Tiermodell untersuchen, ohne dass die Physiologie des Alterns im Organsystem Leber der Ratte bekannt war.

Eine Übertragung der hier vorgestellten Daten auf eine andere Spezies sollte jedoch mit Vorsicht erfolgen, weil bereits innerhalb einer Spezies unterschiedliche Stämme des Versuchstieres Ratte andere Ergebnisse liefern (SCHOEFFNER et al, 1999).

Da überdies einige Parameter der alternden Leber wie z.B Lebergröße zwischen Ratten und Menschen differieren, ist ein Extrapolieren der hier vorgestellten Daten auf den Menschen nicht möglich. Nichtsdestotrotz könnten die hier an Sprague-Dawley Ratten, einem der am häufigsten genutzten Rattenstämme in der tierexperimentellen Forschung, erhobenen Ergebnisse zum Verständnis des physiologischen Alterungsprozesses des Organsystems Leber beitragen.

Da Vitamin A speichernde hepatische Sternzellen eine Schlüsselfunktion in der Entstehung der Leberfibrose innehaben (FRIEDMAN, 1999), ist die detaillierte *in vivo* Analyse dieser Zellen in unterschiedlichen Altersklasse von zentralem Interesse für die Erforschung der Leber-Pathologie. In dieser Studie wurde eine *in vivo* Analyse der Vitamin A-Autofluoreszenz durchgeführt und dabei sowohl die Anzahl als auch die Größe der Fluoreszenzlokalisationen registriert. Mit zunehmendem Alter kam es zu einer Reduktion der gezählten fluoreszierenden Punkte pro Fläche, was auf eine Abnahme an hepatischen



Sternzellen hindeutet. Im Gegensatz dazu war jedoch die autofluoreszierende Fläche der als hepatische Sternzellen identifizierte Punkte mit zunehmendem Alter größer und die Zeitdauer des Ausbleichens länger, was als ein Zeichen für eine vermehrte Vitamin A-Speicherung in den einzelnen Zellen gedeutet werden kann. Der vermehrte Vitamin A-Gehalt konnte auch im direkten Nachweis von Vitamin A und dessen Metaboliten im Lebergewebe mittels HPLC bestätigt werden und die Korrelation von Vitamin A und dessen Metaboliten mit den planimetrisch bestimmten Flächen der Vitamin A-Autofluoreszenz war signifikant.

Sprague-Dawley Ratten unterschiedlichen Alters zeigten hämodynamische Unterschiede. Vergleichbar mit den altersabhängigen physiologischen Veränderungen beim Mensch war der mittlere arterielle Druck mit zunehmendem Alter der Versuchstiere erhöht und die Herzfrequenz nahm ab. Auch bei den allgemeinen Tierdaten (Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht) konnte eine Altersabhängigkeit beobachtet werden, die auch in Einklang mit bereits bekannten Daten von Ratten stehen (SCHOEFFNER et al, 1999). Die Tendenz des Körpergewichtsverlustes bei 24 Monate alten Tieren im Vergleich zu 12 Monate alten Tieren kann am ehesten als generalisierter Protein Katabolismus interpretiert werden, der häufig in hohem Alter zu beobachten ist (BLECHMAN et al, 1999).

Die aktuellen Daten zeigen, dass weder während des Heranwachsens noch während des Alters signifikante Umbauprozesse der Leberarchitektur erfolgen. Das absolute Gewicht der Leber nimmt vom 1 Monat bis zum 12 bzw. 24 Monate alten Tier zu, das relative Gewicht der Leber im Verhältnis zum Körpergewicht hat jedoch bei den 1 Monat alten Tieren sein Maximum mit ca 3,8% und nimmt in den übrigen Altersgruppen signifikant demgegenüber mit Werten zwischen 2,4% und 2,9% ab. Parallel zur 2,9-fachen Gewichtszunahme der Leber im Alter von 1 Monat zu 12 Monaten nahm die Größe der Azini durchschnittlich um das 3,5-fache zu. Die hier vorgestellten Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen einer anderen Studie überein, die gezeigt hat, dass der azinäre Durchmesser bei ca. 300g schweren Ratten (entsprechend einem Alter von ca. 3 Monat) im Vergleich zu 50-70g schweren Ratten zunimmt (DRUGAS et al, 1993) und erweitern die Datenlage dahingehend, dass bis zu 12 Monaten eine Größenzunahme stattfindet, die sich bis ins Alter von 24 Monaten nicht mehr verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die altersabhängige Anpassung der Lebermorphologie an das mit dem Alter vermehrte Lebergewebe nicht durch eine Zunahme der absoluten Anzahl der Leberazini zustande kommt, sondern wahrscheinlich lediglich durch eine Größenzunahme bereits bestehender morphologischer Einheiten. Weiterhin ist die intrahepatische hexagonale Läppchenstruktur, in der das Blut von afferenten Gefäßen

kommend die periportale, die midzonale und die perizentrale Region des Azinus bis in die zentralen postsinusoidalen Venolen durchfließt, in allen Altersgruppen erhalten. Die postsinusoidalen Venolen adaptieren sich an das Größenwachstum der Leberläppchen mit einem proportionalen Längen- und Durchmesser- Wachstum, wie es gleichermaßen für intestinale (UNTHANK et al, 1987) und dermale (VOLLMAR et al, 2000) Arteriolen und Venolen während Wachstum und Altern beschrieben ist. Parallel dazu zeigen auch die Sinusoide eine signifikante Zunahme des Durchmessers bei 3, 12 und 24 Monate alten Tiere im Vergleich zu den 1 Monat alten Tieren. Die Blutfließgeschwindigkeit nahm umgekehrt proportional dazu mit zunehmendem Alter ab, wie auch von Drugas et al. (DRUGAS et al, 1993) gezeigt wurde.

Unter der Vorstellung, dass sich die Anzahl der Sinusoide während der gesamten Lebensdauer nicht ändert, würde man erwarten, dass mit zunehmendem Größenwachstum der Leber sich der Abstand zwischen den Sinusoiden vergrößert. Somit müsste die sinusoidale Dichte entsprechend um den Faktor 3,5 bis 4 bei 12 und 24 Monate alten Tieren im Vergleich zu 1 Monat alten Tieren reduziert sein. Tatsächlich ist die sinusoidale Dichte jedoch nur moderat auf 87 Prozent im Vergleich zu den 1 Monat alten Tieren vermindert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es zu einer Rekrutierung und/oder Neubildung von Sinusoiden mit zunehmendem Alter und Größenwachstum der Leber kommt, um die adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes aufrecht zu erhalten. Eine erhöhte Enzymaktivität der Leberenzyme konnte als mögliches hypoxisches Schädigungszeichen hier nicht im Vergleich zwischen den Altersgruppen festgestellt werden.

Ein wichtiger Punkt der vorliegenden Untersuchung ist, dass sich die Fähigkeit zur Phagozytose der Kupfferzellen nicht zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen unterscheidet. So unterscheidet sich die Kinetik der Clearance der zirkulierenden Latex-Partikel nicht zwischen den Altersgruppen. Daher müssen die Beobachtungen, dass ältere Ratten anfälliger als junge Ratten für durch Endotoxin (DURHAM et al, 1990) oder Cadmium (SANZ et al, 1999; YAMANO et al, 1998) induzierte Leberschäden sind, mit veränderten Eigenschaften und limitierten Möglichkeiten der Kupfferzellen erklärt werden, auf Stressfaktoren zu reagieren und eine adäquate Stressantwort aufzubauen, und nicht durch eine altersabhängige Dysfunktion per se. In Einklang damit wurde postuliert, dass die mit zunehmendem Alter beobachtete Abnahme von SMP-30 (senescent marker protein-30) eine Dysregulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels bewirken könnte mit der Folge einer Veränderung der Signaltransduktion in älteren Geweben mit dadurch bedingten veränderten Reaktionen und

größerer Anfälligkeit gegenüber unterschiedlichen Noxen (FUJITA et al, 1999; FUJITA, 1999; SANZ et al, 1999). Auch könnte die mit zunehmendem Alter beschriebene Zunahme der basalen Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  und die Reduktion der basalen Plasmakonzentration des ambivalenten Zytokins IL-6 mit einer zunehmenden Anfälligkeit gegenüber schädlichen Reizen in Zusammenhang stehen.

In allen Altersgruppen waren die intrahepatischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als Maß für einen höheren proinflammatorische Ist-Zustand des Immunsystems vergleichbar und im Bereich physiologischer Werte, was damit nicht die erhöhte Anfälligkeit im Alter gegenüber Noxen widerspiegelt.

## 8.4. Diskussion der LPS-Exposition und G-CSF-Vorbehandlung im altersgestaffelten Tiermodell

Das Verständnis für die erhöhte Morbidität und Mortalität älterer Patienten durch Sepsis und septischen Schock ist eine der größten Herausforderungen der modernen geriatrischen Medizin. Auch ist die Anzahl an alten Patienten am Gesamtpatientenkollektiv durch die veränderte Altersverteilung unserer Gesellschaft deutlich angestiegen. Somit ist der „alte Patient“ oft kein Ausnahmefall, der auf den Fachbereich der eigentlichen Geriatrie beschränkt ist, sondern zunehmend eine interdisziplinäre Aufgabe. Eine erhöhte Mortalität steht trotz aller Fortschritte der modernen Medizin zweifelsohne mit dem Alter von Patienten in Verbindung (DJAIANI et al, 1997). Bekannt ist, dass mit zunehmendem Alter der Individuen sowohl die Zahl an bakteriellen Infektionen steigt als auch die Mortalität in Folge dieser Infektionen zunimmt (GLADSTONE et al, 1976; YOSHIKAWA, 1983). Die physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen dieser Veränderungen sind jedoch weitgehend unklar.

Die hier vorgestellten Daten nach LPS-Exposition im altersgestaffelten Tiermodell mit 3 (heranwachsend), 12 (erwachsen) und 24 (alt) Monate alten Tieren zeigen, dass ausgewachsene und insbesondere alte Tiere stärker als die heranwachsenden Tiere durch die Auswirkungen der Sepsis beeinträchtigt waren. Das zeigte sich sowohl in der deutlich stärker geschädigten hepatischen Mikrozirkulation als auch in der vermehrten systemischen Zytokinfreisetzung.

Die vergleichbare Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen, die durch das Verhältnis an noch frei fließenden und schon phagozytierten Latex-Partikeln angezeigt wird, weist darauf hin, dass in den 3 Altersklassen eine vergleichbare Endotoxinclearance im Beobachtungszeitraum zu erwarten ist (BIKHAZI et al, 2001; NAKATANI et al, 2001). Es ist daher von vergleichbaren Endotoxin-Plasmakonzentrationen in den ersten Stunden nach Injektion auszugehen. Bei alten und jungen Ratten konnte außerdem ein vergleichbarer Kurvenverlauf für die Abnahmerate der Endotoxinplasmakonzentration gezeigt werden, lediglich mit einer leichten Verlängerung der Halbwertszeit des Endotoxins während der Eliminationsphase bei alten Tieren (KNOOK et al, 1989). Die Daten der vorliegenden Untersuchung einschließlich ist die erhöhte Anfälligkeit alter Ratten gegenüber Endotoxin wahrscheinlich nicht durch Veränderungen der Endotoxinkinetik bedingt, sondern wahrscheinlicher durch die erhöhte Sensitivität der Zielorgane und -gewebe gegenüber den direkten und indirekten Folgen

vergleichbarer Endotoxinkonzentrationen (KNOOK et al, 1989). Die Vermutung, dass ausgewachsene und alte Ratten einen größeren Schaden des Organsystems Leber aufweisen, wird durch die vorliegenden *in vivo* Beobachtungen unterstützt. Dieser Effekt ist wahrscheinlich durch die LPS-induzierte deutlich vermehrte Produktion an proinflammatorischen Zytokinen bei 12 und 24 Monate alten Ratten bedingt. TNF- $\alpha$  konnte als das entscheidende Zytokin in der Induktion, dem Verlauf und der Ausbildung der gram-negativen bakteriellen Sepsis identifiziert werden (GIROIR, 1993). Sowohl die Blockade bzw. die Modulation der Kupfferzellen durch Gadolinum-Chlorid (VOLLMAR et al, 1996b) und G-CSF (VOLLMAR et al, 1997) zur Limitation der TNF- $\alpha$  Produktion und Freisetzung als auch der Einsatz von Medikamenten, die entweder die Produktion oder die Wirkung von TNF- $\alpha$  modifizieren oder vermindern (WINDSOR et al, 1993), haben den entscheidenden Stellenwert von TNF- $\alpha$  in der Vermittlung des Gewebeschadens bewiesen. Auch die in unserer Studie gezeigten deutlich erhöhten Plasmakonzentrationen von IL-1 $\beta$  und IL-6 nach LPS-Exposition bei den ausgewachsenen und alten im Vergleich mit den jungen Tieren können bei der Verursachung des endotoxischen Leberschadens mit TNF- $\alpha$  interagieren. In diesem Zusammenhang ist besonders wichtig, dass bei Patienten im septischen Schock diese Zytokine in erhöhten Konzentrationen nachweisbar waren (WAAGE et al, 1989) und dass nachweislich IL-1 $\beta$  synergistische Wirkungen mit TNF- $\alpha$  haben kann, was letztendlich auch zum Tod als Folge der schweren Sepsis führen kann (WAAGE et al, 1988). Es gibt eine Evidenz dafür, dass eine gestörte endogene humorale Kontrolle der Zytokinproduktion für die exzessiven Zytokinkonzentrationen bei älteren Versuchstieren verantwortlich ist (CHORINCHATH et al, 1996; HYDE et al, 1992). Interessanterweise konnte auch *in vitro* eine erhöhte Zytokinproduktion bei mit Mitogen stimulierten Monozyten von älteren Spendern nachgewiesen werden, obwohl in dieser Versuchsanordnung regulatorische Mechanismen e.g. Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere Achse ausgeschlossen waren (FAGIOLO et al, 1993). Obwohl die zellulären und molekularen Ursachen und Mechanismen der gesteigerten Zytokinproduktion mit zunehmendem Alter noch unklar sind, gibt es keinen Zweifel über den pathophysiologischen Stellenwert für ältere Individuen.

Das Ergebnis mit der wichtigsten klinischen Relevanz dieser Untersuchung ist, dass G-CSF-Präkonditionierung bei alten Ratten keine Abschwächung der auf LPS-Injektion folgenden Immunantwort bewirkte, wohingegen junge Ratten einen signifikanten Benefit durch Vorbehandlung mit dieser immunmodulatorischen Substanz zeigten. G-CSF Vorbehandlung bewirkte 1 Stunde vor LPS-Exposition bei jungen Ratten eine Protektion des Organismus durch eine deutliche TNF- $\alpha$  abhängige Modulation bzw. Dämpfung der

zellulären Immunantwort in der Leber, was durch einen verminderten sinusoidalen Perfusionsausfall und einen verminderten Leberschaden gezeigt werden konnte (VOLLMAR et al, 1997). Die aktuelle Untersuchung erweitert diese Daten dahingehend, dass G-CSF-Vorbehandlung bei 3 Monate und teilweise bei 12 Monate alten Tieren auch über einen längeren Beobachtungszeitraum von 6 Stunden die durch LPS-induzierten Schäden der Leber dämpfen kann. Wahrscheinlich ist sowohl ein verändertes Profil der Zytokinsekretion von Makrophagen bzw. Monozyten (GAMELLI et al, 1995; HARTUNG et al, 1995; VOLLMAR et al, 1997) als auch eine gedämpfte Kupfferzellaktivität (VOLLMAR et al, 1997) für den protektiven Effekt von G-CSF bei 3 und 12 Monate alten endotoxämischen Tieren verantwortlich. Diese Vermutung wird durch die in unseren Daten gezeigten verminderten Zytokinkonzentrationen bei 3 und 12 Monate alten endotoxämischen Tieren nach G-CSF Vorbehandlung unterstützt. Auch die Abnahme der Phagozytose von injizierten Latex-Partikeln durch die Kupfferzellen scheint diese Annahme zu bekräftigen.

Bei den gemessenen Zytokinkonzentrationen könnte argumentiert werden, dass die Konzentrationsunterschiede zu gering seien, um für den fehlenden protektiven Effekt von G-CSF bei alten Tieren verantwortlich zu sein. Die geringen Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen ausgewachsenen und alten Versuchstieren müssen jedoch am ehesten in Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Blutprobenentnahme nach LPS-Stimulation gesehen werden. So ist der Zeitpunkt 6 Stunden nach LPS-Exposition wahrscheinlich zu spät, um die Unterschiede dieser „frühen“ proinflammatorischen Zytokine zu sehen. Es wurde bereits - was diesen Standpunkt unterstützt - gezeigt, dass LPS-Injektion eine rasche Freisetzung von IL-10 bewirkt mit der maximalen Plasmakonzentration 90 Minuten nach Injektion (MARCHANT et al, 1994) und einer Rückkehr auf normale Konzentrationen nach 24 Stunden (STANDIFORD et al, 1995). Vergleichbares gilt auch für IL-6, das ungefähr 180 Minuten nach LPS-Exposition den Peak der Plasmakonzentration erreicht (SADEGHI et al, 1999).

Ob die beobachtete reduzierte Leukozyten-Endothel-Interaktion bei den 3 und 12 Monate alten Tieren nach G-CSF-Präkonditionierung im Vergleich zu alleiniger LPS-Vorbehandlung auf einem direkten antiadhäsiven Effekt des G-CSF beruht oder nur eine Konsequenz der verminderten Zytokinkonzentrationen und verminderten chemotaktischen Stimuli ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Die reduzierte mRNA-Expression von Stickstoffmonoxid-Synthase II (NOS II) und die verminderte zytokinabhängige mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen für neutrophile Granulozyten an nichtparenchymatösen

Leberzellen, wie es bereits für mit G-CSF vorbehandelte Versuchstiere gezeigt wurde (WANNER et al, 1999), muß jedoch als Grund für die reduzierte Leukozytenadhärenz und somit für den abgeschwächten zellvermittelten Gewebeschaden mit in Betracht gezogen werden.

Der fehlende protektive Effekt von G-CSF in alten endotoxämischen Tieren kann verschiedene Ursachen haben. Es gibt Hinweise dafür, dass G-CSF vergleichbare Wirkungen bei jungen und alten gesunden menschlichen Individuen entwickelt (PRICE et al, 1996), was auch von tierexperimentellen Daten unterstützt wird, in denen eine vergleichbare Expression des G-CSF-Oberflächenrezeptors auf neutrophilen Granulozyten bei jungen, ausgewachsenen und alten Ratten gezeigt werden konnte (VOLLMAR et al, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass es keine Unterschiede bei der Produktion, Kinetik im Blut und Gewebsmigration von neutrophilen Granulozyten zwischen freiwilligen jungen und älteren gesunden Probanden gibt (PRICE et al, 1996).

Möglicherweise beruht der fehlende Effekt von G-CSF während einer Infektion im alten Individuum auf einer „trans down“-Regulation des G-CSF-Rezeptors durch Zytokine (HOLLENSTEIN et al, 2000). Es wurde berichtet, dass Endotoxin-Infusion bei gesunden Freiwilligen eine sofort einsetzende und 6 Stunden anhaltenden Down-Regulation des G-CSF-Rezeptors bewirkt (HOLLENSTEIN et al, 2000). Auch konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass es nach LPS-Exposition sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer deutlichen Reduktion der G-CSF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten kommt (VOLLMAR et al, 2002). Da die Wirkung von G-CSF durch Bindung an den G-CSF-Rezeptor resultiert, könnte möglicherweise eine verminderte Expression des G-CSF-Rezeptors auch eine reduzierte biologische Antwort zur Folge haben, wie das auch bei den 24 Monate alten Tieren beobachtet werden konnte. Da die Expression des G-CSF-Rezeptors jedoch bei allen Altersgruppen gleichermaßen durch LPS-Exposition reduziert wurde (VOLLMAR et al, 2002), scheint dieser Pathomechanismus nicht für die hier beobachteten Effekte verantwortlich zu sein. Eine Dysfunktion oder Defekt des G-CSF-Rezeptors bei alten im Vergleich zu jungen Tieren oder eine Unterbrechung oder Modifizierung des folgenden Signalweges bei 24 Monate alten Ratten ist jedoch denkbar und anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht auszuschließen.

Mit zunehmendem Alter scheinen der Rezeptor für G-CSF oder/und weitere homöostatische Regulationsmechanismen Veränderungen zu unterliegen. Als Folge kommt es zu einer gestörten Balance inflammatorischer Zytokine mit fehlender Regulation über G-CSF

und somit auch zu einer Einschränkung der suffizienten Immunantwort beim älteren Individuum.



## 8.5. Schlußfolgerung

Sepsis ist ein häufiges Krankheitsbild und trotz aller Fortschritte der modernen Medizin noch immer mit hoher Morbidität und Mortalität behaftet. Die klinische Beobachtung, dass Sepsis-assoziierte Morbidität und Mortalität mit dem Alter deutlich zunehmen, gewinnt aufgrund der sich wandelnden Alterszusammensetzung unserer Gesellschaft zusätzlich an Bedeutung. Granulozyten-koloniestimulierender Faktor, bekannt geworden als hämatopoetischer Wachstumsfaktor, ist zu Beginn der 90er Jahre als immunmodulierendes Agens erkannt worden und wird mittlerweile unter Studienbedingungen adjuvant zur Therapie der Sepsis eingesetzt. Auch tierexperimentell konnte bei systemischer Endotoxinämie eine Protektion durch G-CSF beobachtet werden. Unklar war jedoch, inwieweit eine derartige Immunmodulation auch im Alter von Erfolg ist.

In einem altersgestaffelten Tiermodell an der Ratte, die als Versuchstierspezies für einen großen Anteil der gerontologischen Untersuchungen genutzt wird, konnte gezeigt werden, dass die Morphologie, Mikrozirkulation und Funktion der Leber sich kaum zwischen den Tiergruppen 1, 3, 12 und 24 Monate unterscheidet. Wichtig war auch, dass kein per se Defizit des Immunsystems unter unstimulierten Bedingungen zu beobachten war.

Endotoxinämie im Alter ist durch eine erhöhte Zytokin-Freisetzung charakterisiert mit der Konsequenz einer stärkeren Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und Parenchymintegrität der Leber. Vorbehandlung durch G-CSF ist in der Lage, bei jungen und ausgewachsenen, nicht aber bei alten Tieren die systemisch-inflammatorische Antwort auf Endotoxin und damit die Hepatotoxizität wirksam zu reduzieren. Bei alten Patienten sollte somit die Indikation zur Gabe von G-CSF zur adjuvanten Therapie der Sepsis kritisch diskutiert werden.

## 9. Verzeichnis der Abkürzungen

A.	-	Arteria
ALP	-	Alkalische Phosphatase
ALT	-	Alanin-Amino-Transferase
AST	-	Aspartat-Amino-Transferase
BGA	-	Blutgasanalyse
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	circa
CCD Kamera	-	„charge coupled device“ Kamera
CD	-	cluster of differentiation
d.h.	-	das heißt
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
e.g.	-	exempli gratia
GA	-	Gauge
G-CSF	-	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSFR	-	G-CSF Rezeptor
GLDH	-	Glutamatdehydrogenase
GLDH	-	Glutamat-Dehydrogenase
HDL	-	high density lipoprotein
HPLC	-	high performance liquid chromatography
i.p.	-	intraperitoneal
i.v.	-	intravenös
IFN- $\gamma$	-	Interferon- $\gamma$
IL-10	-	Interleukin-10
IL-1 $\beta$	-	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	-	Interleukin-4
IL-6	-	Interleukin-6
IVM	-	Intravital-Mikroskopie
LBP	-	LPS bindendes Protein
LPS	-	Lipopolysaccharid
MAP	-	mittlerer arterieller Druck („mean arterial pressure“)
MIP-2	-	Makrophagen inflammatorisches Protein-2

---

MW	-	Mittelwert
NaCl	-	Kochsalz
sCD	-	soluble cluster of differentiation
SEM	-	Standard Fehler des Mittelwertes
SIRS	-	systemic inflammatory response syndrome
sog.	-	sogenannt
TNF- $\alpha$	-	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
V.	-	Vena
vs.	-	versus
z.B.	-	zum Beispiel

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere *Herrn Dr. med. Sven Richter*, der mich während der Zeit der experimentellen Versuche betreute. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sein persönliches Engagement für mich und meine erste wissenschaftliche Arbeit sowie für seine geduldige und freundliche Unterstützung bin ich Herrn Dr. Richter zu großem Dank verpflichtet.

Besonderer Dank gilt auch *Frau Professor Dr. med. Brigitte Vollmar* für die Überlassung des Themas und ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Auswertung der Experimente, bei der Analyse und Diskussion der Daten.

*Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger*, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, danke ich für seine jahrelange Unterstützung und Förderung bei der Durchführung meiner Dissertationsarbeit und für seine zeitintensive und geduldige Korrektur meiner Dissertationsschrift.

Des weiteren möchte ich mich bei *Frau Beate Wolf* und *Frau Elisabeth Gluding* bedanken, deren Kompetenz und freundliches Wesen mir immer eine große Hilfe bedeuteten.

Mein Dank gilt auch *Frau Ruth Nickels*, die mir die sehr zeitaufwändige Aufarbeitung der Gewebeproben für die HPLC-Analysen abnahm. Für ihre Unterstützung möchte ich ihnen hiermit ganz herzlich danken.

Ein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir immer wieder zuteil wurden.

Bedanken möchte ich mich bei *meiner Mutter*, die mich immer mit aller Kraft unterstützte.

Ganz besonders danke ich meiner *Ehefrau Carolin Pradarutti*, die mir durch ihre Diskussionsbereitschaft, Motivation und Unterstützung jederzeit hilfreich zur Seite gestanden hat.

## 11. Literaturliste

1. Alexander C; Rietschel, ET  
Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity.  
J Endotoxin Res 2001; 7 (3): 167-202
2. Allen RC; Stevens, PR; Price, TH; Chatta, GS; Dale, DC  
In vivo effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil oxidative functions in normal human volunteers.  
J Infect Dis 1997; 175 (5): 1184-1192
3. Azoulay E; Delclaux, C  
Is there a place for granulocyte colony-stimulating factor in non-neutropenic critically ill patients?  
Intensive Care Med 2004; 30 (1): 10-17
4. Baatz H; Steinbauer, M; Harris, AG; Krombach, F  
Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G.  
Int J Microcirc Clin Exp 1995; 15 (2): 85-91
5. Badger AM  
Enhanced superoxide production by rat alveolar macrophages stimulated in vitro with biological response modifiers.  
J Leukoc Biol 1986; 40 (6): 725-736
6. Bagge U; Amundson, B; Lauritzen, C  
White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock.  
Acta Physiol Scand 1980; 108 (2): 159-163
7. Barker JH; Menger, MD; Sack, FU; Messmer, K  
[Nutritive skin circulation in partial ischemia: effect of various vasoactive substances].  
Vasa 1988; 17 (1): 37-41
8. Barsig J; Bundschuh, DS; Hartung, T; Bauhofer, A; Sauer, A; Wendel, A  
Control of fecal peritoneal infection in mice by colony-stimulating factors.  
The Journal of infectious diseases 1996; 174 (4): 790-799
9. Bauer M; Marzi, I; Thuma, B; Bach, F; Buhren, V; Larsen, R  
Dose-related pattern of sinusoidal leukocyte adhesion in sublobular regions of the liver after systemic endotoxin challenge in the rat.  
Shock 1994; 1 (2): 135-140

10. Belardelli F  
Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response.  
APMIS 1995; 103 (3): 161-179
11. Bereiter-Hahn J; Seipel, KH; Voth, M; Ploem, JS  
Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6 GO.  
Cell Biochem Funct 1983; 1 (3): 147-155
12. Berk SL; Smith, JK  
Infectious diseases in the elderly.  
Med Clin North Am 1983; 67 (2): 273-293
13. Bikhazi AB; Jurjus, AR; Kamal, MT; Al-Housseini, AM; Saab, RN; Jaroudi, WA; Bitar, KM  
Kinetics of lipopolysaccharide clearance by Kupffer and parenchyma cells in perfused rat liver.  
Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2001; 129 (4): 339-348
14. Blechman MB; Gelb, AM  
Aging and gastrointestinal physiology.  
Clinics in geriatric medicine 1999; 15 (3): 429-438
15. Bloch EH  
The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination.  
Angiology 1955; 6 (4): 340-349
16. Boneberg EM; Hareng, L; Gantner, F; Wendel, A; Hartung, T  
Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma.  
Blood 2000; 95 (1): 270-276
17. Boneberg EM; Hartung, T  
Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1beta release via suppressed processing of proIL-1beta, whereas TNF-alpha release is inhibited on the level of proTNF-alpha formation.  
Eur J Immunol 2002a; 32 (6): 1717-1725
18. Boneberg EM; Hartung, T  
Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF.  
Inflamm Res 2002b; 51 (3): 119-128
19. Brigham KL; Meyrick, B  
Interactions of granulocytes with the lungs.  
Circ Res 1984; 54 (6): 623-635

20. Budniewski A  
Changes in the dynamic compliance coefficient of the lungs and breathing mechanics during administration of diethyl ether and halothane for general anaesthesia with spontaneous respiration.  
Anaesth Resusc Intensive Ther 1975; 3 (1): 35-41
21. Busch CJ; Wanner, GA; Menger, MD; Vollmar, B  
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) reduces not only gram-negative but also gram-positive infection-associated proinflammatory cytokine release by interaction between Kupffer cells and leukocytes.  
Inflamm Res 2004; 53 (5): 205-210
22. Carden DL; Smith, JK; Korthuis, RJ  
Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence.  
Circ Res 1990; 66 (5): 1436-1444
23. Carr R; Modi, N; Dore, C  
G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections.  
Cochrane Database Syst Rev 2003; (3): CD003066-
24. Cavaillon JM; dib-Conquy, M; Fitting, C; Adrie, C; Payen, D  
Cytokine cascade in sepsis.  
Scand J Infect Dis 2003; 35 (9): 535-544
25. Chaudry IH  
Sepsis: lessons learned in the last century and future directions.  
Arch Surg 1999; 134 (9): 922-929
26. Chorinchath BB; Kong, LY; Mao, L; McCallum, RE  
Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice.  
J Immunol 1996; 156 (4): 1525-1530
27. Chun K; Zhang, J; Biewer, J; Ferguson, D; Clemens, MG  
Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers.  
Shock 1994; 1 (1): 3-9
28. Cohen J; Glauser, MP  
Septic shock: treatment.  
Lancet 1991; 338 (8769): 736-739
29. Damas P; Canivet, JL; De, GD; Vrindts, Y; Albert, A; Franchimont, P; Lamy, M  
Sepsis and serum cytokine concentrations.  
Crit Care Med 1997; 25 (3): 405-412

- 
30. Dan C; Wake, K  
Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal and perfused rat liver.  
Exp Cell Res 1985; 158 (1): 75-85
  31. del Zoppo GJ; Schmid-Schonbein, GW; Mori, E; Copeland, BR; Chang, CM  
Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons.  
Stroke 1991; 22 (10): 1276-1283
  32. DeVries ME; Ran, L; Kelvin, DJ  
On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses.  
Semin Immunol 1999; 11 (2): 95-104
  33. Dietzmann K; Letko, G; Sokolowski, A  
Mitochondrial membrane potential in living cells: evidence from studies with rhodamine 6 G as fluorescent probe.  
Exp Pathol 1987; 31 (1): 47-51
  34. Dinarello CA  
Anti-cytokine therapies in response to systemic infection.  
J Invest Dermatol Symp Proc 2001; 6 (3): 244-250
  35. Djaiani G; Ridley, S  
Outcome of intensive care in the elderly.  
Anaesthesia 1997; 52 (12): 1130-1136
  36. Drugas GT; Chun, KE; Miescher, EA; Clemens, MG  
Maturational differences in hepatic microhemodynamics in rats.  
J Surg Res 1993; 54 (3): 246-253
  37. Dugo L; Collin, M; Allen, DA; Patel, NS; Bauer, I; Mervaala, EM; Louhelainen, M; Foster, SJ; Yaqoob, MM; Thiemermann, C  
GSK-3beta inhibitors attenuate the organ injury/dysfunction caused by endotoxemia in the rat.  
Crit Care Med 2005; 33 (9): 1903-1912
  38. Durham SK; Brouwer, A; Barelds, RJ; Horan, MA; Knook, DL  
Comparative endotoxin-induced hepatic injury in young and aged rats.  
J Pathol 1990; 162 (4): 341-349
  39. Eguchi H; McCuskey, PA; McCuskey, RS  
Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice.  
Hepatology 1991; 13 (4): 751-757



- 
40. Eichacker PQ; Waisman, Y; Natanson, C; Farese, A; Hoffman, WD; Banks, SM; MacVittie, TJ  
Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis.  
Journal of applied physiology 1994; 77 (5): 2366-2373
  41. Eilers F; Bartels, H; Jungermann, K  
Zonal expression of the glucokinase gene in rat liver. Dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle demonstrated by in situ hybridization.  
Histochemistry 1993; 99 (2): 133-140
  42. Ellis CG  
Computer-Assisted Analysis of Video Images: A New Tool for Microvascular Measurement. 1986; 229-244
  43. Ellis CG; Ellsworth, ML; Pittman, RN; Burgess, WL  
Application of image analysis for evaluation of red blood cell dynamics in capillaries.  
Microvasc Res 1992; 44 (2): 214-225
  44. Esmon CT  
Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?  
Crit Care Med 2004; 32 (5 Suppl): S219-S222
  45. Fagiolo U; Cossarizza, A; Scala, E; Fanales-Belasio, E; Ortolani, C; Cozzi, E; Monti, D; Franceschi, C; Paganelli, R  
Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people.  
Eur J Immunol 1993; 23 (9): 2375-2378
  46. Fink MP; O'Sullivan, BP; Menconi, MJ; Wollert, SP; Wang, H; Youssef, ME; Bellelsle, JM  
Effect of granulocyte colony-stimulating factor on systemic and pulmonary responses to endotoxin in pigs.  
J Trauma 1993; 34 (4): 571-577
  47. Finkelstein MS; Petkun, WM; Freedman, ML; Antopol, SC  
Pneumococcal bacteremia in adults: age-dependent differences in presentation and in outcome.  
Journal of the American Geriatrics Society 1983; 31 (1): 19-27
  48. Fletcher MA; McKenna, TM; Quance, JL; Wainwright, NR; Williams, TJ  
Lipopolysaccharide detoxification by endotoxin neutralizing protein.  
J Surg Res 1993; 55 (2): 147-154
  49. Friedman SL  
Cytokines and fibrogenesis.  
Seminars in liver disease 1999; 19 (2): 129-140

- 
50. Fujita T  
Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function.  
Biochem Biophys Res Commun 1999; 254 (1): 1-4
  51. Fujita T; Shirasawa, T; Maruyama, N  
Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance.  
Mech Ageing Dev 1999; 107 (3): 271-280
  52. Gabrilove JL  
Introduction and overview of hematopoietic growth factors.  
Semin Hematol 1989; 26 (2 Suppl 2): 1-4
  53. Galanos C; Freudenberg, MA  
Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity.  
Immunobiology 1993; 187 (3-5): 346-356
  54. Gale LM; McColl, SR  
Chemokines: extracellular messengers for all occasions?  
Bioessays 1999; 21 (1): 17-28
  55. Gamelli RL; He, LK; Liu, H  
Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor treatment improves macrophage suppression of granulocyte and macrophage growth after burn and burn wound infection.  
J Trauma 1995; 39 (6): 1141-1146
  56. Gebbers JO; Laissue, JA  
Bacterial translocation in the normal human appendix parallels the development of the local immune system.  
Ann N Y Acad Sci 2004; 1029: 337-343
  57. Gelman S  
General anesthesia and hepatic circulation.  
Can J Physiol Pharmacol 1987; 65 (8): 1762-1779
  58. Gelman S; Dillard, E; Bradley, EL, Jr.  
Hepatic circulation during surgical stress and anesthesia with halothane, isoflurane, or fentanyl.  
Anesth Analg 1987; 66 (10): 936-943
  59. Giroir BP  
Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade.  
Crit Care Med 1993; 21 (5): 780-789

- 
60. Gladstone JL; Recco, R  
Host factors and infectious diseases in the elderly.  
Med Clin North Am 1976; 60 (6): 1225-1240
  61. Glauser MP; Zanetti, G; Baumgartner, JD; Cohen, J  
Septic shock: pathogenesis.  
Lancet 1991; 338 (8769): 732-736
  62. Gorgen I; Hartung, T; Leist, M; Niehorster, M; Tiegs, G; Uhlig, S; Weitzel, F; Wendel, A  
Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha.  
J Immunol 1992; 149 (3): 918-924
  63. Goris RJ; te Boekhorst, TP; Nuytinck, JK; Gimbrere, JS  
Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?  
Arch Surg 1985; 120 (10): 1109-1115
  64. Griffen WO, Jr.; Levitt, DG; Ellis, CJ; Lifson, N  
Intrahepatic distribution of hepatic blood flow: single-input studies.  
Am J Physiol 1970; 218 (5): 1474-1479
  65. Grisham MB; Hernandez, LA; Granger, DN  
Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia.  
Am J Physiol 1986; 251 (4 Pt 1): G567-G574
  66. Gross JF; Aroesty, J  
Mathematical models of capillary flow: a critical review.  
Biorheology 1972; 9 (4): 225-264
  67. Gross-Weege W; Weiss, M; Schneider, M; Wenning, M; Harms, B; Dumon, K; Ohmann, C; Roher, HD  
Safety of a low-dosage Filgrastim (rhG-CSF) treatment in non-neutropenic surgical intensive care patients with an inflammatory process.  
Intensive care medicine 1997; 23 (1): 16-22
  68. Gruson D; Hilbert, G; Vargas, F; Valentino, R; Chene, G; Boiron, JM; Reiffers, J; Gbikpi-Benissan, G; Cardinaud, JP  
Impact of colony-stimulating factor therapy on clinical outcome and frequency rate of nosocomial infections in intensive care unit neutropenic patients.  
Crit Care Med 2000; 28 (9): 3155-3160
  69. Gutschmann-Conrad A; Pahlavani, MA; Heydari, AR; Richardson, A  
Expression of heat shock protein 70 decreases with age in hepatocytes and splenocytes from female rats.  
Mechanisms of ageing and development 1999; 107 (3): 255-270

- 
70. Haberstroh J; Breuer, H; Lucke, I; Massarrat, K; Fruh, R; Mand, U; Hagedorn, P; Brunnberg, L; von Specht, BU  
Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemodynamic and cytokine response in a porcine model of *Pseudomonas* sepsis.  
Shock 1995; 4 (3): 216-224
71. Hakansson L; Hoglund, M; Jonsson, UB; Torsteinsdottir, I; Xu, X; Venge, P  
Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil and eosinophil adhesion.  
Br J Haematol 1997; 98 (3): 603-611
72. Hanzon V  
Liver cell secretion under normal and pathologic conditions studied by fluorescence microscopy on living rats.  
Acta Physiol Scand Suppl 1952; 28 (101): 1-268
73. Hartung T; Docke, WD; Gantner, F; Krieger, G; Sauer, A; Stevens, P; Volk, HD; Wendel, A  
Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers.  
Blood 1995; 85 (9): 2482-2489
74. Heidecke CD; Weighardt, H; Hensler, T; Bartels, H; Holzmann, B  
[Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival].  
Chirurg 2000; 71 (2): 159-165
75. Heine H; Rietschel, ET; Ulmer, AJ  
The biology of endotoxin.  
Mol Biotechnol 2001; 19 (3): 279-296
76. Hendriks HF; Horan, MA; Durham, SK; Earnest, DL; Brouwer, A; Hollander, CF; Knook, DL  
Endotoxin-induced liver injury in aged and subacutely hypervitaminotic A rats.  
Mech Ageing Dev 1987; 41 (3): 241-250
77. Hendriks HF; Verhoofstad, WA; Brouwer, A; De Leeuw, AM; Knook, DL  
Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver.  
Exp Cell Res 1985; 160 (1): 138-149
78. Higuti T; Niimi, S; Saito, R; Nakasima, S; Ohe, T; Tani, I; Yoshimura, T  
Rhodamine 6G, inhibitor of both H<sup>+</sup>-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates.  
Biochim Biophys Acta 1980; 593 (2): 463-467
79. Hiraoka Y; Sedat, JW; Agard, DA  
The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures.  
Science 1987; 238 (4823): 36-41

- 
80. Hirata K; Kaneko, A; Ogawa, K; Hayasaka, H; Onoe, T  
Effect of endotoxin on rat liver. Analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats.  
Lab Invest 1980; 43 (2): 165-171
  81. Hollenstein U; Homoncik, M; Stohlawetz, PJ; Marsik, C; Sieder, A; Eichler, HG; Jilma, B  
Endotoxin down-modulates granulocyte colony-stimulating factor receptor (CD114) on human neutrophils.  
J Infect Dis 2000; 182 (1): 343-346
  82. Holman RG; Maier, RV  
Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome.  
Arch Surg 1988; 123 (12): 1491-1495
  83. Holst O; Ulmer, AJ; Brade, H; Flad, HD; Rietschel, ET  
Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins.  
FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 16 (2): 83-104
  84. Hotchkiss RS; Karl, IE  
The pathophysiology and treatment of sepsis.  
N Engl J Med 2003; 348 (2): 138-150
  85. Hyde SR; McCallum, RE  
Lipopolysaccharide-tumor necrosis factor-glucocorticoid interactions during cecal ligation and puncture-induced sepsis in mature versus senescent mice.  
Infect Immun 1992; 60 (3): 976-982
  86. Hyde SR; Stith, RD; McCallum, RE  
Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice.  
Infect Immun 1990; 58 (3): 619-624
  87. Iimuro Y; Yamamoto, M; Kohno, H; Itakura, J; Fujii, H; Matsumoto, Y  
Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats--analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia.  
J Leukoc Biol 1994; 55 (6): 723-728
  88. Intaglietta M; Silverman, NR; Tompkins, WR  
Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods.  
Microvasc Res 1975; 10 (2): 165-179
  89. Jaeschke H; Farhood, A; Smith, CW  
Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo.  
FASEB J 1990; 4 (15): 3355-3359

- 
90. Jaeschke H; Smith, CW  
Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature.  
Am J Physiol 1997; 273 (6 Pt 1): G1169-G1173
  91. Joris I; Zand, T; Nunnari, JJ; Krolikowski, FJ; Majno, G  
Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats.  
Am J Pathol 1983; 113 (3): 341-358
  92. Jungermann K; Katz, N  
Functional specialization of different hepatocyte populations.  
Physiol Rev 1989; 69 (3): 708-764
  93. Kamiike W; Watanabe, F; Hashimoto, T; Tagawa, K; Ikeda, Y; Nakao, K; Kawashima, Y  
Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver.  
J Biochem (Tokyo) 1982; 91 (4): 1349-1356
  94. Klyszcz T; Junger, M; Jung, F; Zeintl, H  
[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy].  
Biomed Tech (Berl) 1997; 42 (6): 168-175
  95. Knisely MH  
Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules.  
1939; (73): 269-270
  96. Knittel T; Aurisch, S; Neubauer, K; Eichhorst, S; Ramadori, G  
Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair.  
Am J Pathol 1996; 149 (2): 449-462
  97. Knook DL; Brouwer, A  
Kupffer cells and the acute phase response: the effect of aging.  
Immunol Invest 1989; 18 (1-4): 339-350
  98. Komatsu H; Koo, A; Guth, PH  
Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation.  
Microvasc Res 1990; 40 (1): 1-13
  99. Konno H; Lowe, PJ; Hardison, WG; Miyai, K; Nakamura, S; Baba, S  
Breakdown of hepatic tight junctions during reoxygenation injury.  
Transplantation 1992; 53 (6): 1211-1214
  100. Kopydlowski KM; Salkowski, CA; Cody, MJ; van Rooijen, N; Major, J; Hamilton, TA; Vogel, SN

- Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo.  
J Immunol 1999; 163 (3): 1537-1544
101. Kragstjerg P; Holmberg, H; Vikerfors, T  
Dynamics of blood cytokine concentrations in patients with bacteremic infections.  
Scand J Infect Dis 1996; 28 (4): 391-398
102. Kuhns DB; Alvord, WG; Gallin, JI  
Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans.  
J Infect Dis 1995; 171 (1): 145-152
103. Roux P  
An update on the pathophysiology of sepsis.  
SADJ 2004; 59 (4): 163, 165-
104. Lehr HA; Menger, MD; Messmer, K  
Impact of leukocyte adhesion on myocardial ischemia/reperfusion injury: conceivable mechanisms and proven facts.  
J Lab Clin Med 1993; 121 (4): 539-545
105. Levy MM; Fink, MP; Marshall, JC; Abraham, E; Angus, D; Cook, D; Cohen, J; Opal, SM; Vincent, JL; Ramsay, G  
2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.  
Crit Care Med 2003; 31 (4): 1250-1256
106. Long GD; Negrin, RS; Hoyle, CF; Kusnierz, GC; Schriber, JR; Blume, KG; Chao, NJ  
Multiple cycles of high dose chemotherapy supported by hematopoietic progenitor cells as treatment for patients with advanced malignancies.  
Cancer 1995; 76 (5): 860-868
107. Luftner D; Possinger, K  
Pegfilgrastim -- rational drug design for the management of chemotherapy-induced neutropenia.  
Onkologie 2005; 28 (11): 595-602
108. Lundblad R; Nesland, JM; Giercksky, KE  
Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats.  
Crit Care Med 1996; 24 (5): 820-826
109. Marchant A; Bruyns, C; Vandenabeele, P; Ducarme, M; Gerard, C; Delvaux, A; De Groote, D; Abramowicz, D; Velu, T; Goldman, M  
Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia.  
Eur J Immunol 1994; 24 (5): 1167-1171

- 
110. Marzi I; Knee, J; Buhren, V; Menger, M; Trentz, O  
Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation.  
Surgery 1992; 111 (1): 90-97
  111. Mayer AM; Spitzer, JA  
Continuous infusion of Escherichia coli endotoxin in vivo primes in vitro superoxide anion release in rat polymorphonuclear leukocytes and Kupffer cells in a time-dependent manner.  
Infect Immun 1991; 59 (12): 4590-4598
  112. McCuskey RS  
The Hepatic Microvascular System. 1983; 57-68
  113. McCuskey RS  
Microscopic Methods for Studying the Microvasculature of Internal Organs. 1986; 247-264
  114. Medawar PB  
The uniqueness of the individual.  
Basic Books, New York 1957;
  115. Menger MD; Marzi, I; Messmer, K  
In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats.  
Eur Surg Res 1991; 23 (3-4): 158-169
  116. Menger MD; Pelikan, S; Steiner, D; Messmer, K  
Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox".  
Am J Physiol 1992a; 263 (6 Pt 2): H1901-H1906
  117. Menger MD; Steiner, D; Messmer, K  
Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow".  
Am J Physiol 1992b; 263 (6 Pt 2): H1892-H1900
  118. Menger MD; Vollmar, B  
Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research.  
Br J Surg 1996; 83 (5): 588-601
  119. Miles SA  
The use of hematopoietic growth factors in HIV infection and AIDS-related malignancies.  
Cancer Invest 1991; 9 (2): 229-238



- 
120. Miller RA  
The cell biology of aging: immunological models.  
Journal of gerontology 1989; 44 (1): B4-B8
121. Minnich DJ; Moldawer, LL  
Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis:  
progress and pitfalls.  
Proc Nutr Soc 2004; 63 (3): 437-441
122. Miura E; Procianoy, RS; Bittar, C; Miura, CS; Miura, MS; Mello, C; Christensen, RD  
A randomized, double-masked, placebo-controlled trial of recombinant granulocyte  
colony-stimulating factor administration to preterm infants with the clinical  
diagnosis of early-onset sepsis.  
Pediatrics 2001; 107 (1): 30-35
123. Moore MA  
The clinical use of colony stimulating factors.  
Annual review of immunology 1991; 9: 159-191
124. Nachbaur D; Duba, HC; Feichtinger, H; Kropshofer, G; Nussbaumer, W;  
Schwaighofer, H; Niederwieser, D  
Polychemotherapy combined with G-CSF-mobilized donor buffy coat transfusion  
for granulocytic sarcoma after allogeneic BMT for AML.  
Bone Marrow Transplant 1997; 19 (9): 947-949
125. Nagano K; Gelman, S; Parks, DA; Bradley, EL, Jr.  
Hepatic oxygen supply-uptake relationship and metabolism during anesthesia in  
miniature pigs.  
Anesthesiology 1990; 72 (5): 902-910
126. Nakatani Y; Fukui, H; Kitano, H; Nagamoto, I; Tsujimoto, T; Kuriyama, S; Kikuchi,  
E; Hoppou, K; Tsujii, T  
Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rats with  
liver cirrhosis.  
Liver 2001; 21 (1): 64-70
127. Nicola NA  
Granulocyte colony-stimulating factor.  
Immunol Ser 1990; 49: 77-109
128. Nishimura T; Yoshida, Y; Watanabe, F; Koseki, M; Nishida, T; Tagawa, K;  
Kawashima, Y  
Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the  
extent of ischemic necrosis of the rat liver.  
Hepatology 1986; 6 (4): 701-707
129. Nunes G; Blaisdell, FW; Margaretten, W  
Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma.  
Arch Surg 1970; 100 (5): 546-556

- 
130. Nuytinck HK; Offermans, XJ; Kubat, K; Goris, JA  
Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study.  
Arch Surg 1988; 123 (12): 1519-1524
131. Penberthy TW; Jiang, Y; Graves, DT  
Leukocyte adhesion molecules.  
Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8 (4): 380-388
132. Post S; Gonzalez, AP; Palma, P; Rentsch, M; Stiehl, A; Menger, MD  
Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat.  
Hepatology 1992; 16 (3): 803-809
133. Post S; Palma, P; Rentsch, M; Gonzalez, AP; Otto, G; Menger, MD  
Importance of rinse solution vs preservation solution in prevention of microcirculatory damage after liver transplantation in the rat.  
Transplant Proc 1993a; 25 (1 Pt 2): 1607-
134. Post S; Rentsch, M; Palma, P; Gonzalez, AP; Menger, MD  
Assessment of microhemodynamics after liver transplantation by in vivo microscopy in the rat.  
Transplant Proc 1993b; 25 (4): 2597-2598
135. Price TH; Chatta, GS; Dale, DC  
Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans.  
Blood 1996; 88 (1): 335-340
136. Rappaport AM  
The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure.  
Beitr Pathol 1976; 157 (3): 215-243
137. Rappaport AM  
The microcirculatory hepatic unit.  
Microvascular research 1973; 6 (2): 212-228
138. Rappaport AM  
The structural and functional unit in the human liver (liver acinus).  
Anat Rec 1958; 130 (4): 673-689
139. Rappaport AM; BOROWY, ZJ; LOUGHEED, WM; LOTTO, WN  
Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology.  
Anat Rec 1954; 119 (1): 11-33
140. Remick DG; Newcomb, DE; Bolgos, GL; Call, DR  
Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis:

- lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture.  
Shock 2000; 13 (2): 110-116
141. Remick DG; Strieter, RM; Eskandari, MK; Nguyen, DT; Genord, MA; Raiford, CL; Kunkel, SL  
Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations.  
Am J Pathol 1990; 136 (1): 49-60
142. Remick DG; Ward, PA  
Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis.  
Shock 2005; 24 Suppl 1: 7-11
143. Rensing H; Bauer, I; Kubulus, D; Wolf, B; Winning, J; Ziegeler, S; Bauer, M  
Heme oxygenase-1 gene expression in pericentral hepatocytes through beta1-adrenoceptor stimulation.  
Shock 2004; 21 (4): 376-387
144. Rensing H; Bauer, M  
[Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies].  
Anaesthesist 2001; 50 (11): 819-841
145. Riepl M; Fietkau, R; Sauer, R  
[G-CSF in radiochemotherapy].  
Strahlenther Onkol 1997; 173 (2): 76-82
146. Rietschel ET; Brade, H; Holst, O; Brade, L; Muller-Loennies, S; Mamat, U; Zahringer, U; Beckmann, F; Seydel, U; Brandenburg, K; Ulmer, AJ; Mattern, T; Heine, H; Schletter, J; Loppnow, H; Schonbeck, U; Flad, HD; Hauschildt, S; Schade, UF; Di, PF; Kusumoto, S; Schumann, RR  
Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification.  
Curr Top Microbiol Immunol 1996; 216: 39-81
147. Rietschel ET; Schletter, J; Weidemann, B; El-Samalouti, V; Mattern, T; Zahringer, U; Seydel, U; Brade, H; Flad, HD; Kusumoto, S; Gupta, D; Dziarski, R; Ulmer, AJ  
Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation.  
Microb Drug Resist 1998; 4 (1): 37-44
148. Roberts AW  
G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!  
Growth Factors 2005; 23 (1): 33-41
149. Roilides E; Pizzo, PA  
Modulation of host defenses by cytokines: evolving adjuncts in prevention and treatment of serious infections in immunocompromised hosts.  
Clin Infect Dis 1992; 15 (3): 508-524

- 
150. Rüttinger D; Vollmar, B; Kempter, B; Messmer, K  
Failure of Kupffer cell blockade to prevent disseminated intravascular coagulation in endotoxemic rats despite improved survival.  
Langenbecks Arch Surg 1998; 383 (1): 75-80
151. Rüttinger D; Vollmar, B; Wanner, GA; Messmer, K  
In vivo assessment of hepatic alterations following gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade.  
J Hepatol 1996; 25 (6): 960-967
152. Sadeghi S; Wallace, FA; Calder, PC  
Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice.  
Immunology 1999; 96 (3): 404-410
153. Saltzman RL; Peterson, PK  
Immunodeficiency of the elderly.  
Rev Infect Dis 1987; 9 (6): 1127-1139
154. Sanz N; Diez-Fernandez, C; Alvarez, AM; Fernandez-Simon, L; Cascales, M  
Age-related changes on parameters of experimentally-induced liver injury and regeneration.  
Toxicol Appl Pharmacol 1999; 154 (1): 40-49
155. Schmeling DJ; Caty, MG; Oldham, KT; Guice, KS; Hinshaw, DB  
Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion.  
Surgery 1989; 106 (2): 195-201
156. Schmidt E; Schmidt, FW  
Enzyme release.  
J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25 (9): 525-540
157. Schoeffner DJ; Warren, DA; Muralidara, S; Bruckner, JV; Simmons, JE  
Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age.  
J Toxicol Environ Health A 1999; 56 (7): 449-462
158. Schumann RR; Rietschel, ET; Loppnow, H  
The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin.  
Med Microbiol Immunol (Berl) 1994; 183 (6): 279-297
159. Seifert WF; Bosma, A; Hendriks, HF; van Leeuwen, RE; van Thiel-de Ruiter GC; Seifert-Bock, I; Knook, DL; Brouwer, A  
Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl4-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats.  
Liver 1995; 15 (1): 1-8

- 
160. Senoo H; Stang, E; Nilsson, A; Kindberg, GM; Berg, T; Roos, N; Norum, KR; Blomhoff, R  
Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver.  
J Lipid Res 1990; 31 (7): 1229-1239
161. Sherman IA; Fisher, MM  
Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy.  
Hepatology 1986; 6 (3): 444-449
162. Sherman IA; Pappas, SC; Fisher, MM  
Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis.  
Am J Physiol 1990; 258 (2 Pt 2): H460-H465
163. Shintaku T; Murata, T; Yamaguchi, K; Makita, T  
Hepatic histopathology of a vitamin A overdose in mouse liver.  
J Electron Microsc (Tokyo) 1998; 47 (3): 263-267
164. Shiratori Y; Geerts, A; Ichida, T; Kawase, T; Wisse, E  
Kupffer cells from CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells.  
J Hepatol 1986; 3 (3): 294-303
165. Shiratori Y; Ichida, T; Geerts, A; Wisse, E  
Modulation of collagen synthesis by fat-storing cells, isolated from CCl<sub>4</sub>- or vitamin A-treated rats.  
Dig Dis Sci 1987; 32 (11): 1281-1289
166. Slaaf DW  
Characteristics of Optical Systems for Intravital Microscopy. 1986; 211-228
167. Slaaf DW; Tangelder, GJ; Teirlinck, HC; Oude Vrielink, HH; Reneman, RS  
Flow cessation pressures in the rabbit tenuissimus muscle.  
Int J Microcirc Clin Exp 1986; 5 (1): 3-9
168. Smith WS; Sumnicht, GE; Sharpe, RW; Samuelson, D; Millard, FE  
Granulocyte colony-stimulating factor versus placebo in addition to penicillin G in a randomized blinded study of gram-negative pneumonia sepsis: analysis of survival and multisystem organ failure.  
Blood 1995; 86 (4): 1301-1309
169. Standiford TJ; Strieter, RM; Lukacs, NW; Kunkel, SL  
Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor.  
J Immunol 1995; 155 (4): 2222-2229

- 
170. Statistisches Bundesamt  
Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 2002;
171. Suematsu M; Oda, M; Suzuki, H; Kaneko, H; Watanabe, N; Furusho, T; Masushige, S; Tsuchiya, M  
Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation.  
Microvasc Res 1993; 46 (1): 28-42
172. Sumimoto K; Inagaki, K; Yamada, K; Kawasaki, T; Dohi, K  
Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level.  
Transplantation 1988; 46 (4): 506-509
173. Thijs LG; Hack, CE  
Time course of cytokine levels in sepsis.  
Intensive Care Med 1995; 21 Suppl 2: S258-S263
174. Thoman ML; Weigle, WO  
The cellular and subcellular bases of immunosenescence.  
Advances in immunology 1989; 46: 221-261
175. Turnbull IR; Wlczorek, JJ; Osborne, D; Hotchkiss, RS; Coopersmith, CM; Buchman, TG  
Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture.  
Shock 2003; 19 (4): 310-313
176. Unthank JL; Bohlen, HG  
Quantification of intestinal microvascular growth during maturation: techniques and observations.  
Circ Res 1987; 61 (5): 616-624
177. van der PT; van Deventer, SJ  
Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis.  
Infect Dis Clin North Am 1999; 13 (2): 413-26, ix
178. Varin F; Huet, PM  
Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver.  
J Clin Invest 1985; 76 (5): 1904-1912
179. Vedder NB; Fouty, BW; Winn, RK; Harlan, JM; Rice, CL  
Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock.  
Surgery 1989; 106 (3): 509-516
180. Vollmar B  
[Microcirculation and oxygen supply to the liver in hemorrhagic shock and sepsis].  
Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1995; 30 Suppl 1: S52-S54

- 
181. Vollmar B; Glasz, J; Leiderer, R; Post, S; Menger, MD  
Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion.  
American journal of pathology 1994a; 145 (6): 1421-1431
  182. Vollmar B; Glasz, J; Menger, MD; Messmer, K  
Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence.  
Surgery 1995a; 117 (2): 195-200
  183. Vollmar B; Glasz, J; Post, S; Menger, MD  
Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver.  
Journal of hepatology 1994b; 20 (2): 301-304
  184. Vollmar B; Glasz, J; Senkel, A; Menger, MD; Messmer, K  
Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia.  
Zentralbl Chir 1993; 118 (11): 691-696
  185. Vollmar B; Menger, MD  
The use of intravital microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery.  
Langenbecks Arch Surg 1998a; 383 (3-4): 282-285
  186. Vollmar B; Menger, MD; Glasz, J; Leiderer, R; Messmer, K  
Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury.  
Am J Physiol 1994c; 267 (5 Pt 1): G786-G793
  187. Vollmar B; Messner, S; Wanner, GA; Hartung, T; Menger, MD  
Immunomodulatory action of G-CSF in a rat model of endotoxin-induced liver injury: an intravital microscopic analysis of Kupffer cell and leukocyte response.  
J Leukoc Biol 1997; 62 (6): 710-718
  188. Vollmar B; Morgenthaler, M; Amon, M; Menger, MD  
Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice.  
American journal of physiology - Heart and circulatory physiology 2000; 279 (4): H1591-H1599
  189. Vollmar B; Richter, S; Menger, MD  
Leukocyte stasis in hepatic sinusoids.  
Am J Physiol 1996a; 270 (5 Pt 1): G798-G803
  190. Vollmar B; Rüttinger, D; Wanner, GA; Leiderer, R; Menger, MD  
Modulation of kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats.  
Shock 1996b; 6 (6): 434-441

- 
191. Vollmar B; Senkel, A; Menger, MD  
In vivo evidence that intercellular adhesion molecule-1 does not mediate  
endotoxin-induced hepatic leukocyte-endothelial cell interaction.  
J Hepatol 1995b; 23 (5): 613-616
192. Vollmar B; Siegmund, S; Menger, MD  
An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular  
derangements in developing cirrhosis in rats.  
Hepatology 1998b; 27 (6): 1544-1553
193. Vollmar B; Pradarutti, S; Nickels, RM; Menger, MD  
Age-associated loss of immunomodulatory protection by granulocyte-colony  
stimulating factor in endotoxic rats.  
Shock 2002; 18 (4): 348-354
194. Waage A; Brandtzaeg, P; Halstensen, A; Kierulf, P; Espevik, T  
The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic  
shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome.  
J Exp Med 1989; 169 (1): 333-338
195. Waage A; Espevik, T  
Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha/cachectin in  
mice.  
The Journal of experimental medicine 1988; 167 (6): 1987-1992
196. Wang JE; Dahle, MK; Yndestad, A; Bauer, I; McDonald, MC; Aukrust, P; Foster, SJ;  
Bauer, M; Aasen, AO; Thiernemann, C  
Peptidoglycan of Staphylococcus aureus causes inflammation and organ injury in  
the rat.  
Crit Care Med 2004; 32 (2): 546-552
197. Wanner GA; Ertel, W; Muller, P; Hofer, Y; Leiderer, R; Menger, MD; Messmer, K  
Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through  
Kupffer cell activation.  
Shock 1996; 5 (1): 34-40
198. Wanner GA; Stockle, V; Bauer, M; Menger, MD; Vollmar, B  
Differential gene expression of CINC, NOS II, and ICAM-1 in endotoxemic liver  
cells by rG-CSF.  
Langenbecks Arch Surg 1999; 384 (2): 216-221
199. Warnatz H  
Immunsystem, Physiologische Grundlagen.  
Klinische Pathophysiologie (Hrsg Siegenthaler, W ) 1994; 432-465
200. Weiss M; Gross, WW; Harms, B; Schneider, EM  
Filgrastim (RHG-CSF) related modulation of the inflammatory response in patients  
at risk of sepsis or with sepsis.  
Cytokine 1996; 8 (3): 260-265



- 
201. Weiss M; Moldawer, LL; Schneider, EM  
Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis.  
Blood 1999; 93 (2): 425-439
202. Weiss M; Voglic, S; Harms-Schirra, B; Lorenz, I; Lasch, B; Dumon, K; Gross-Weege, W; Schneider, EM  
Effects of exogenous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim, rhG-CSF) on neutrophils of critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome depend on endogenous G-CSF plasma concentrations on admission.  
Intensive Care Med 2003; 29 (6): 904-914
203. Welte K; Bonilla, MA; Gillio, AP; Gabrilove, JL; O'Reilly, RJ; Souza, LM  
Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: in vivo effects on myelopoiesis in primates.  
Behring Inst Mitt 1988; (83): 102-106
204. Wiedermann FJ; Mittermayr, M; Hoffmann, G; Schobersberger, W  
Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in infectious diseases: still a debate.  
Wien Klin Wochenschr 2001; 113 (3-4): 90-96
205. Windsor AC; Walsh, CJ; Mullen, PG; Cook, DJ; Fisher, BJ; Blocher, CR; Leeper-Woodford, SK; Sugerman, HJ; Fowler, AA  
Tumor necrosis factor-alpha blockade prevents neutrophil CD18 receptor upregulation and attenuates acute lung injury in porcine sepsis without inhibition of neutrophil oxygen radical generation.  
J Clin Invest 1993; 91 (4): 1459-1468
206. Woltmann A; Hamann, L; Ulmer, AJ; Gerdes, J; Bruch, HP; Rietschel, ET  
Molecular mechanisms of sepsis.  
Langenbecks Arch Surg 1998; 383 (1): 2-10
207. Wray GM; Foster, SJ; Hinds, CJ; Thiemermann, C  
A cell wall component from pathogenic and non-pathogenic gram-positive bacteria (peptidoglycan) synergises with endotoxin to cause the release of tumour necrosis factor-alpha, nitric oxide production, shock, and multiple organ injury/dysfunction in the rat.  
Shock 2001; 15 (2): 135-142
208. Xu Y; Rojkind, M; Czaja, MJ  
Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells.  
Gastroenterology 1996; 110 (6): 1870-1877
209. Yamane M; Tanaka, Y; Marumo, F; Sato, C  
Role of hepatic vitamin A and lipocyte distribution in experimental hepatic fibrosis.  
Liver 1993; 13 (5): 282-287

- 
210. Yamano T; Shimizu, M; Noda, T  
Age-related change in cadmium-induced hepatotoxicity in Wistar rats: role of Kupffer cells and neutrophils.  
Toxicol Appl Pharmacol 1998; 151 (1): 9-15
211. Yoshikawa TT  
Geriatric infectious diseases: an emerging problem.  
Journal of the American Geriatrics Society 1983; 31 (1): 34-39
212. Zeintl H; Tompkins, W; Messmer, K; Intaglietta, M  
Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations.  
Prog Appl Microcirc ; 1986 ; 11: 1 10 1986; 1986; 11: 1-10
213. Zivot JB; Hoffman, WD  
Pathogenic effects of endotoxin.  
New Horiz 1995; 3 (2): 267-275

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sascha Pradarutti
Adresse	Hirschbergerstraße 1, 66424 Homburg
Telefon	06841 – 150352
E-Mail	saschapradarutti@gmx.de
Familienstand	verheiratet, 3 Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Geburtsdaten	02. April 1975 in Cochem

### Schulische Ausbildung

08/1981 – 07/1985	Grundschule Cochem
08/1985 – 07/1987	Gemeinsame Orientierungsstufe der Staatlichen Realschule Cochem und des Martin-von-Cochem Gymnasiums
08/1987 – 06/1994	Martin-von-Cochem Gymnasium mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
06/1994 – 10/1995	Zivildienst als Rettungssanitäter des Deutschen Roten Kreuzes in Cochem

### Studium

10/1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
08/1997	Physikum mit der Examensnote „gut“
08/1998	1. Staatsexamen mit der Examensnote „befriedigend“
08/2001	2. Staatsexamen mit der Examensnote „gut“
11/2002	3. Staatsexamen mit der Examensnote „gut“
11/2002	Ärztliche Prüfung mit der Examensnote „gut“

**Beruf**

01/2003	Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin an dem Universitätsklinikum des Saarlandes
10/2003 bis 3/2004	Elternzeit
seit 10/2004	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin an dem Universitätsklinikum des Saarlandes

**Praktische Tätigkeiten**

10/1997 – 03/1998	Wissenschaftliche Hilfskraft im Kursus Makroskopische Anatomie des Anatomischen Institutes der Universität des Saarlandes bei Herrn Prof. Dr. med. K. Uhlmann
05/1999 – 10/2001	Mitarbeit in der anästhesiologischen Gemeinschaftspraxis Drs. Langner und Tormann, Homburg

**Dissertation**

Beginn 06/1998	Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes mit dem Thema „Altersabhängige Modulation der Endotoxin-induzierten Schädigung der Rattenleber durch Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF)“
11/2000	Poster-Präsentation auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie in Mainz
05/2001	Vortrag auf dem 118. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München

**Veröffentlichungen**

- Pradarutti, S; Richter, S; Menger, MD; Vollmar, B  
Altersabhängige Wirkung von G-CSF bei der Endotoxinämie der Rattenleber  
Chir Forum 2001; 30: 387-389
- Vollmar, B; Pradarutti, S; Nickels, RM; Menger, MD  
Age-associated loss of immunomodulatory protection by granulocyte-colony stimulating factor in  
endotoxic rats.  
Shock 2002; 18 (4): 348-354
- Vollmar, B; Pradarutti, S; Richter, S; Menger, MD  
In vivo quantification of ageing changes in the rat liver from early juvenile to senescent life.  
Liver 2002; 22 (4): 330-341